



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*canis familiaris*) con *ehrlichiosis* en el distrito de Chiclayo, Lambayeque-Perú

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Miguel André CERVANTES SANTA CRUZ

ASESOR

Luis Antonio HOYOS SIFUENTES

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cervantes M. Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*canis familiaris*) con *ehrlichiosis* en el distrito de Chiclayo, Lambayeque-Perú [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2018.



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Viernes 25 de Mayo de 2018**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0100-EPMV/FMV-2018, integrado por los siguientes profesores:

MV Mg. Amanda Chávez Velásquez	Presidente del Jurado
MV Mg. Luis Antonio Hoyos Sifuentes	Asesor de la Tesis
QF Mg. Olga Li Elías	Miembro del Jurado
MV Viviana Fernández Paredes	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **CERVANTES SANTA CRUZ, MIGUEL ANDRÉ** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE GARRAPATAS COLECTADAS DE PERROS (*Canis familiaris*) CON *Ehrlichiosis* EN EL DISTRITO DE CHICLAYO, LAMBAYEQUE - PERÚ”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesora de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las 13:20 horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....
Amanda Chávez Velásquez: MV. Mg. Prof. Principal, D.E.

.....
Luis Antonio Hoyos Sifuentes: Mg. MV Prof. Asociado T.C.

.....
Olga Li Elías: Mg. QF. Prof. Principal D.E.

.....
Viviana Fernández Paredes: MV Prof. Asociada T.C.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi amada familia conformada por mis padres, mi hermana y mi braquito por todo el amor que me han brindado y por ser la fuerza que me ha servido para seguir adelante desde mis primeros pasos en el colegio, durante la apasionante y exigente carrera y hasta la actualidad. Gracias a ustedes disfruto de una vida feliz, los amo muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis amigos de vida Luis Enrique, Marcos, Glen, Orlando, Gabriel, Alberto y David por apoyarme de diversas maneras en el desarrollo de mi tesis y por su apoyo durante mi sustentación.

Gracias a esa persona especial por siempre confiar en mi como muy pocas personas lo hacen, hiciste posible que esto sea realidad gracias a tu apoyo incondicional. Nuestra historia comenzó con un jugo y sin darnos cuenta hoy somos uno. Gracias por tu apoyo y amor incondicional.

Gracias al Dr Luis Gomez y Luis Hoyos por su apoyo y consejos brindados durante la carrera. Ambos han influenciado de manera positiva en mi visión sobre esta apasionante carrera. Ustedes son mis padres Veterinarios.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DEL CONTENIDO.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ANEXOS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Biología de las Garrapatas.....	3
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	3
2.1.2 Tipos de ciclo biológico.....	8
2.1.3 Rhipicephalus sanguineus.....	9
2.2 Métodos de Identificación.....	19
2.2.1 Importancia de la Identificación exacta de las Garrapatas.....	19
2.2.2 Identificación Molecular.....	20
III. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Diseño de estudio.....	25
3.2 Lugar de ejecución y período de estudio.....	25
3.3 Descripción y tamaño de muestra.....	25
3.4 Materiales, reactivos y equipos.....	26
3.5 Colecta de Garrapatas.....	27
3.6 Conservación e Identificación de las muestras.....	28
3.7 Procesamiento de las muestras.....	28
3.7.1 Identificación Morfológica.....	28
3.7.2 Identificación Molecular.....	31
IV. RESULTDOS.....	35
4.1 Identificación Morfológica.....	35
4.2 Identificación Molecular.....	38
V. DISCUSIÓN.....	42
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. LITERATURA CITADA.....	47
VIII. APÉNDICE.....	61

RESUMEN

Rhipicephalus sanguineus s.l es la garrapata con mayor distribución a nivel mundial capaz de transmitir patógenos a humanos y animales, siendo la Ehrlichiosis canina la principal enfermedad transmitida por este artrópodo en el Perú. El objetivo de este estudio fue identificar morfológica y molecularmente las garrapatas de perros con Ehrlichiosis en el distrito de Chiclayo en Lambayeque-Perú. Los perros fueron diagnosticados con Ehrlichiosis para que puedan ser sometidos al muestreo. Se colectaron 297 garrapatas de 74 perros las cuales fueron conservadas en crioviales con etanol al 70% y remitidas al Laboratorio de Epidemiología y Economía de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su evaluación. La población completa de garrapatas fue identificada morfológicamente como *Rhipicephalus sanguineus* s.l de los cuales 9 especímenes fueron identificados mediante procedimientos moleculares usando el gen mitocondrial 16S rADN. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Brasil y Colombia (Linaje del Norte), Argentina, Chile y Uruguay (Linaje del Sur), España, Italia y Sudáfrica. Las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú mostraron una divergencia genética intraespecífica de 0-0.3% y 6.1-6.8% con el Linaje del Norte y Linaje del Sur respectivamente. El análisis filogenético agrupó las secuencias del Perú junto a las del Linaje del Norte y Sudáfrica, segregándolas de las secuencias del Linaje del Sur y Europa. De esta manera nuestros resultados demuestran que *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Chiclayo, Lambayeque- Perú pertenece al Linaje del Norte que, a diferencia del Linaje del Sur, son conocidos por ser vectores competentes de *Ehrlichia canis*. Se hacen necesarios futuras investigaciones para identificar el resto de poblaciones del país y verificar la posible diferencia de competencia vectorial para otros patógenos en orden de entender mejor la epidemiología de las enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus* s.l en el Perú.

Palabras clave: garrapatas, *Rhipicephalus sanguineus* s.l, claves taxonómicas, gen 16rRNA, Linaje del Norte, *Ehrlichia canis*

ABSTRACT

Rhipicephalus sanguineus s.l is the most widely distributed tick in the world capable of transmitting pathogens to humans and animals, with Ehrlichiosis canine being the main disease transmitted by this arthropod in Peru. The objective of this study was to identify morphologically and molecularly ticks of dogs with Ehrlichiosis in the district of Chiclayo in Lambayeque-Peru. The dogs were diagnosed with Ehrlichiosis so that they could be sampled. We collected 297 ticks from 74 dogs which were preserved in cryovials with 70% ethanol and sent to the Laboratory of Epidemiology and Economics of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University of San Marcos for evaluation. The complete population of ticks was identified morphologically as *Rhipicephalus sanguineus* s.l of which 9 specimens were identified by molecular procedures using the mitochondrial gene 16S rDNA. The obtained sequences were aligned with sequences of *Rhipicephalus sanguineus* s.l from Brazil and Colombia (Lineage of the North), Argentina, Chile and Uruguay (Lineage of the South), Spain, Italy and South Africa. The sequences of *Rhipicephalus sanguineus* s.l from Peru showed an intraspecific genetic divergence of 0-0.3% and 6.1-6.8% with the Northern Lineage and Southern Lineage respectively. The phylogenetic analysis grouped the sequences of Peru along with those of the Northern Lineage and South Africa, segregating them from the Southern and European Lineage sequences. In this way, our results show that *Rhipicephalus sanguineus* s.l from Chiclayo, Lambayeque-Peru belongs to the Northern Lineage that unlike the Southern Lineage, are known to be competent vectors of *Ehrlichia canis*. Future research is necessary to identify the rest of the country's populations and verify the possible difference in vector competence for other pathogens in order to better understand the epidemiology of diseases transmitted by *Rhipicephalus sanguineus* s.l in Peru.

Keywords: ticks, *Rhipicephalus sanguineus* s.l, taxonomic keys, 16rRNA gene, Northern lineage, *Ehrlichia canis*

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Datos de los especímenes <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l incluidos en el análisis de las secuencias del gen 16S rADN.	34
Cuadro 2	Clasificación por sexo y estadio evolutivo de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	35
Cuadro 3	Matriz de divergencia intraespecífica absoluta (% de diferencia de nucleótidos) de secuencias parciales de 358 pares de base del gen mitocondrial 16S rADN de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presencia de capítulo y de escudo quitinoso (flecha azul).....	36
Figura 2. Vista ventral. Presencia de surco anal posterior (flecha roja).....	36
Figura 3. Vista dorsal. Piezas bucales pequeñas. Segundo segmento del palpo sin proyección lateral y ambos palpos no son más largos que la base del capítulo (flecha azul). Base del capítulo hexagonal (flecha roja).....	37
Figura 4. Vista ventral. Palpos más largos que el hipostoma (flecha azul), presencia de coxa dividida del primer par de patas (flecha roja).	37
Figura 5. Vista ventral. Placa espiracular en forma de coma (flecha roja)	37
Figura 6. Escudo quitinoso cubriendo la superficie dorsal en un 50% en un espécimen hembra (6a, flecha azul) y 100% (6b, flecha roja) además de presentar un par de placas adanales (6b, flecha azul) en un espécimen macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.....	38
Figura 7. Productos de amplificación del gen 16S rADN de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras fueron positivas con un tamaño molecular de 450 pares de base. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base, N: Control negativo.....	38
Figura 8. a, b, c y d. Alineación de secuencias de nucleótidos del gen 16S rADN de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l de Brasil, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y las muestras obtenidas en Perú (Sample 78-87).....	39
Figura 9. Árbol filogenético Neighbor-joining usando el parámetro de distancia Kimura 2 de secuencias parciales del gen 16S rADN (358 pares de base) de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l de Brasil, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y las muestras obtenidas en Perú (Sample 78-87).....	41

LISTA DE ANEXOS

Apéndice 1. Clave para la clasificación de los géneros en estado adulto de <i>Ixodidae</i> (Keirans y Litwak, 1989).....	62
---	----

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de los vertebrados y debido a su capacidad para transmitir varios patógenos tanto a humanos como animales, existen necesidades médicas y veterinarias para la identificación exacta de las garrapatas (Bowman y Nuttall, 2008). Trabajos realizados en Sudamérica, incluyendo el Perú, reportan que *Rhipicephalus sanguineus* s.l es la especie de garrapata es la más encontrada en caninos, realizando su identificación basada en criterios morfológicos (Liberato, 1998; Bustamante, 1998; Estares, 1999; Nunton, 2000). Estudios realizados en poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* s.l demuestran diversidad morfológica (Oliveira, 2005), diferencias biológicas, incompatibilidad reproductiva (Szabó, 2005) y una amplia divergencia genética intraespecífica (Moraes-Filho, 2011) entre dichos especímenes sugiriendo así la existencia de dos especies denominadas Linaje del Norte y Linaje del Sur bajo el nombre de *Rhipicephalus sanguineus* s.l (Nava, 2012). En Sudamérica, *Rhipicephalus sanguineus* s.l ha sido reconocido como potencial vector de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Rickettsia coronii*, *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia massiliae* (Venzal, 2017). Sin embargo, existen diferencias en la competencia vectorial entre los linajes del Norte y Sur, mostrando así que garrapatas pertenecientes al Linaje del Norte son vectores competentes de *Ehrlichia canis* (Cicuttin, 2015; Moraes-Filho, 2015). En el Perú la enfermedad más importante transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* s.l es la Ehrlichiosis canina, hallándose valores altos de seropositividad y visualización de mórulas microscópicas

en caninos en la región norte del país (Robles, 2008; Oliva 2015). Por lo tanto, la identificación exacta de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en la región norte es de suma importancia para el entendimiento de la epidemiología y el mejoramiento de los programas de control y prevención de las enfermedades transmitidas por dicho vector en el Perú.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biología de las Garrapatas

2.1.1 Clasificación Taxonómica

Las garrapatas pertenecen al Phylum *Arthropoda*, Clase *Arachnida*, Subclase *Acari*, Superorden *Parasitiformes*, Orden *Ixodida*, Superfamilia *Ixodidae*. A su vez esta superfamilia contiene las familias *Ixodidae*, *Argasidae* y *Nuttalliellidae* (Krantz, 2009). La familia *Ixodidae* está conformada por 14 géneros y 722 especies, la familia *Argasidae* por 5 géneros y 208 especies, mientras que la familia *Nuttalliellidae* está representada sólo por una especie (Venzal, 2017).

Las garrapatas que pertenecen a la familia *Ixodidae* se caracterizan por poseer un dimorfismo sexual marcado, un capítulo que puede ser observado desde una vista dorsal y por presentar un escudo dorsal, por esta última característica se les conocen como “Garrapatas duras” (Faccioli, 2011). Por otro lado, en las garrapatas de la familia *Argasidae* el dimorfismo sexual no es marcado, el capítulo sólo puede ser observado desde ventral y no presentan un escudo quitinoso, por dicha razón se les conocen como “Garrapatas blandas” (Venzal, 2017).

La Familia *Ixodidae* es usualmente dividida, basada en características morfológicas, en Prostriata y Metastriata. Los Prostriata se caracterizan morfológicamente por la presencia del surco anal anterior al ano, siendo representada por las garrapatas del género *Ixodes*, mientras que los Metastriata se caracterizan por la presencia del surco anal posterior al ano y está representada por el resto de especies (Keirans y Litwak, 1989).

2.1.1.1 Morfología de los principales géneros de garrapatas

Género *Rhipicephalus*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es medio (3-5mm) incluyendo las piezas bucales. La sutura lateral está ausente. La textura del tegumento presenta estriaciones. Las piezas bucales son anteriores. Los artículos del palpo son pequeños (Walker, 2003). La base del capítulo tiene márgenes laterales angulares de forma hexagonal. Las patas no poseen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas presenta un par de espinas largas e iguales (Dantas-Torres, 2008).

El escudo está presente en la hembra (Conscutum en el macho). Las ornamentaciones están normalmente ausentes en el escudo y conscutum, pero existen algunas especies con ornamentación. Los ojos están presentes y son planos a ligeramente convexos (Venzal, 2017). Los festones están presentes en machos (en las hembras ingurgitadas no son notorias). Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales están presentes sólo en machos. El surco anal se encuentra posterior al ano (Quiroz, 2005).

Género *Amblyomma*

El tamaño de las garrapatas sin ingurgitar es largo (6-7mm) incluyendo las piezas bucales. La sutura lateral está ausente y la textura del tegumento presenta estriaciones (Venzal, 2017). Las piezas bucales son anteriores, la base del capítulo tiene márgenes laterales rectos y el segundo par de artículos del palpo son más largos que el primer y tercer par. Las patas tienen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas tiene un par de espinas de distinto tamaño (Quiroz, 2005).

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho). La ornamentación está presente en el escudo y conscutum de muchas especies. Los ojos están siempre presentes pudiendo ser planos o convexos. Los festones están presentes en machos y hembras. Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales en los machos son indistintas y el surco anal se encuentra posterior al ano (Walker, 2003).

Subgénero *Boophilus*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es pequeño (2-3mm). La sutura lateral está ausente. La textura del tegumento tiene estriaciones. Las piezas bucales son anteriores. Los artículos del palpo son pequeños y la base del capítulo tiene márgenes laterales angulares. Las patas no tienen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas presenta un par de pequeñas espinas (Keirans y Litwak, 1989).

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho). La ornamentación está ausente en el escudo y el conscutum. Los están presentes pero indistintos. Los festones están ausentes en hembras y machos. Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales están presentes sólo en machos. El surco anal es indistinto (Walker, 2003)

Género *Dermacentor*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es medio (4-5mm) incluyendo las piezas bucales. Las piezas bucales son anteriores. El segundo par de artículos del palpo son anchos. La base del capítulo tiene márgenes laterales rectos y dorsalmente es rectangular. Las patas no tienen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas presenta un par de largas e iguales espinas. La coxa del cuarto par de patas es muy larga (Venzal, 2017).

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho). La ornamentación está presente en el escudo y el conscutum excepto en *Dermacentor nitens*. Los ojos están presentes y usualmente planos a ligeramente convexos. Los festones están presentes en machos. Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales están ausentes en machos. El surco anal es posterior al ano (Walker, 2003).

Género *Haemaphysalis*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es pequeño (3mm) incluyendo las piezas bucales. La sutura lateral está ausente. La textura del tegumento tiene estriaciones. Las piezas bucales son anteriores. El segundo par de artículos del palpo son anchos (Keirans y Litwak, 1989). La base del capítulo tiene márgenes laterales rectos. Las patas no tienen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas presenta un par de espinas diferentes (Walker, 2003)

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho). Las ornamentaciones están ausentes en el escudo y conscutum. Los ojos están siempre ausentes. Los festones están presentes en machos. Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales están ausentes en machos. El surco anal es posterior al ano (Quiroz, 2005).

Género *Hyalomma*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es largo (5-6mm) incluyendo las piezas bucales. La sutura lateral está ausente. La textura del tegumento tiene estriaciones. Las piezas bucales son anteriores. El segundo par de artículos del palpo son más largos que los artículos del tercer par. La base del capítulo tiene márgenes laterales y angulares medios. Las patas usualmente tienen anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas presenta un par de espinas largas e iguales (Walker, 2003; Venzal, 2017).

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho) y presenta una coloración marrón. Las ornamentaciones están usualmente ausentes en el escudo y conscutum. Los ojos están presentes y son convexos. Los festones están presentes en machos y en las hembras no son muy notorios (Quiroz, 2005). Las placas espiraculares son largas y posteriores al cuarto par de patas. Las placas ventrales están presentes sólo en machos. El surco anal se encuentra posterior al ano (Keirans y Litwak, 1989).

Género *Ixodes*

El tamaño de los adultos sin ingurgitar es medio (3-4 mm) incluyendo las piezas bucales. El surco lateral está ausente. La textura del tegumento tiene estriaciones. Las piezas bucales son anteriores. El segundo par de artículos del palpo son más largos que el tercer par de artículos (Walker, 2003). La base del capítulo tiene márgenes laterales rectas. Las patas no tienen

anillos suaves y son delgadas. La coxa del primer par de patas tiene un par de espinas diferentes (Venzal, 2017).

El escudo está presente en la hembra (conscutum en el macho). Las ornamentaciones están ausentes en el escudo y conscutum. Los ojos están siempre ausentes (Quiroz, 2005). Los festones están ausentes en los machos y hembras. Las placas espiraculares son largas y posterior al cuarto par de patas. Las placas ventrales están presentes sólo en machos. El surco anal se encuentra anterior al ano (Keirans y Litwak, 1989).

Género *Argas*

Los adultos alcanzan un largo de 6 mm. Presenta una sutura lateral. La textura del tegumento es mamilar. El escudo y conscutum están ausentes. Las patas no presentan anillos suaves. No presentan ojos. Las piezas bucales son ventrales. Los artículos del palpo son pequeños. La base del capítulo presenta márgenes laterales rectos (Walker, 2003).

Las placas espiraculares son pequeñas y están entre el tercer y cuarto par de patas. Los festones y las placas ventrales están ausentes en los machos. El surco anal está ausente en ambos sexos. Las espinas de la coxa del primer par de patas están ausentes (Quiroz, 2005).

Género *Ornithodoros*

El tamaño de los adultos es de 8 mm. La sutura lateral está ausente. La textura del tegumento es mamilar. El escudo y conscutum está ausente. Las patas no poseen anillos suaves y son delgadas. Los ojos están usualmente ausentes. Las piezas bucales son ventrales. Los artículos de los palpos son pequeños. La base del capítulo presenta márgenes laterales y rectos (Walker, 2003).

Las placas espiraculares son pequeñas y están entre el tercer y cuarto par de patas. Los festones y las placas ventrales están ausentes en los machos. El surco anal está ausente en ambos sexos. Las espinas de la coxa del primer par de patas están ausentes (Quiroz, 2005).

Género *Otobius*

El tamaño es de 6 mm. La sutura lateral está ausente en el estadio ninfal. La textura del tegumento es espinosa. El escudo y conscutum está ausente. Las patas no presentan anillos

suaves y son delgadas. Los ojos están ausentes. Las piezas bucales son ventrales pudiendo ser anterior en ninfas. Los artículos del palpo son pequeños. La base del capítulo presenta márgenes laterales y rectos (Walker, 2003).

Las placas espiraculares son pequeñas y están entre el tercer y cuarto par de patas. Los festones y las placas ventrales están ausentes en los machos. El surco anal está ausente en ambos sexos. Las espinas de la coxa del primer par de patas están ausentes (Quiroz, 2005).

2.1.2 Tipos de ciclo biológico

Dentro de la familia *Ixodidae* encontramos garrapatas con tres tipos de ciclo biológico: Ciclo biológico de uno, dos o tres hospederos. Las garrapatas de un solo hospedero permanecen en el hospedero durante todas las fases parasíticas mudando a ninfas y adultos en el mismo individuo, desprendiéndose del mismo únicamente cuando son hembras ingurgitadas (Levy, 2002). Este tipo de ciclo biológico es menos común, pero ocurre en todos los especímenes del sub género *Boophilus* (Walker, 2003).

El ciclo biológico de dos hospederos es similar pero sólo las larvas y ninfas se alimentan del mismo hospedero, mientras que los adultos se alimentan de otro hospedero. *Hyalomma detritum* y *Rhipicephalus evertsi* poseen este tipo de ciclo biológico (Jongejan, 1994; Walker, 2003).

El ciclo biológico de las garrapatas de tres hospederos es el más común en la mayoría de especies de la familia *Ixodidae*. Las larvas ingurgitadas se desprenden del hospedero para mudar en el ambiente, posteriormente las ninfas se adhieren a otro hospedero y se desprenden como ninfas ingurgitadas para mudar en hembras y de esta manera completar el ciclo parasítico en otro hospedero (Dantas-Torres, 2010; Venzal, 2017). El ciclo biológico de tres hospederos es lento y puede demorar hasta 6 meses e incluso varios años (Walker, 2003). *Rhipicephalus sanguineus* presenta este tipo de ciclo biológico y es la especie más ampliamente distribuida en el mundo, siendo su capacidad para transmitir agentes patógenos a humanos y animales la razón de su importancia en Medicina Veterinaria y el área de Salud Pública (Dantas-Torres, 2010).

2.1.3 *Rhipicephalus sanguineus*

2.1.3.1 Taxonomía.

El taxón cosmopolita tradicionalmente llamado *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto constituye en realidad un complejo de especies denominado “grupo *Rhipicephalus sanguineus*” o “*Rhipicephalus sanguineus* sensu lato” (Nava, 2015).

El complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l) incluye 12 especies de garrapatas (Pegram et al., 1987). Sin embargo, no se ha llegado aún a un consenso sobre esta clasificación (Gray, 2013) y las similitudes morfológicas entre las especies de garrapatas pertenecientes al grupo *Rhipicephalus sanguineus* hace su identificación una tarea difícil, incluso para taxonomistas experimentados (Dantas-Torres, 2013). La situación taxonómica se complica más debido a que la descripción original de *Rhipicephalus sanguineus* sensu stricto era poca informativa, no poseía ilustraciones y el espécimen “tipo” se perdió (Venzal, 2017). Por las razones mencionadas anteriormente se sugiere que el nombre “*Rhipicephalus sanguineus*” no debería ser asignado a cualquier población de garrapatas y en su lugar debería usarse el término “*Rhipicephalus sanguineus* sensu lato” (Guglielmone, 2014; Nava, 2015).

En la última década muchos estudios han intentado evaluar la variabilidad genética de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l) y su relación geográfica. Dichos estudios han demostrado que poblaciones de garrapatas previamente determinadas como *Rhipicephalus sanguineus* pertenecen a dos diferentes linajes, Linaje del Norte o Tropical y Linaje del Sur o Templado, con incompatibilidad reproductiva y divergencia genética significativa (Szabó, 2005; Burlini, 2010; Morales-Filho, 2011; Nava, 2012; Levin, 2012).

El Linaje del Norte está distribuido desde el norte de Argentina hasta México, mientras que el Linaje del Sur está asociado a localidades de clima templado y frío de Argentina, Brasil, Chile, Uruguay y Estados Unidos (Morales-Filho, 2011, Levin, 2012; Nava, 2015). Al parecer la distribución geográfica de ambos linajes está limitada a una zona entre 24 y 25 grados de latitud sur (Nava, 2012).

2.1.3.2 Comportamiento

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) es una especie de garrapata endoflica, monotrófica y de tres hospederos, es decir, está adaptada a vivir dentro del hogar, todos sus estadios de desarrollo se alimentan del mismo hospedero y cada estadio de vida requiere un nuevo hospedero del cual alimentarse (Dantas-Torres, 2010). Sin embargo, es capaz de sobrevivir en ambientes externos y alimentarse de otro tipo de hospederos que no pertenecen a su cadena trófica natural, mostrando así una gran capacidad de adoptar diferentes estrategias de supervivencia cuando las condiciones ambientales son adversas y la disponibilidad de animales hospederos cambia (Lord, 2014).

Gracias a la capacidad de completar su ciclo biológico entero dentro del hogar, *R. sanguineus* puede sobrevivir en climas más fríos (Lord, 2014), presentando una gran adaptabilidad a las edificaciones urbanas y alta prolificidad en micro hábitats como huecos y grietas del suelo y paredes que ofrecen condiciones de temperatura y humedad para el mantenimiento de sus poblaciones (García, 2007).

R. sanguineus puede adoptar estrategias de emboscada o comportamiento de caserío cuando busca un hospedero del cuál alimentarse, dichos patrones de comportamiento han sido adquiridos a lo largo de su evolución siendo parte de la estrategia de la garrapata para la supervivencia y perpetuación de la especie (Dantas-Torres, 2010).

2.1.3.3 Alimentación

En el hospedero, *R. sanguineus* usa el par de quelíceros para atravesar la piel del hospedero y de esta manera insertar el hipostoma junto con los quelíceros dentro de la epidermis del hospedero (Dantas-Torres, 2010). Durante la fijación, la garrapata secreta por medio de sus glándulas salivares una sustancia similar al cemento con la cual forma un cono que se extiende desde la superficie de la epidermis hasta el estrato córneo (Szabó, 1999).

Los dentículos del hipostoma ayudan a asegurar las piezas bucales en el cemento, facilitando la fijación a la piel por el retroceso de los dentículos embebidos en el cemento (Needham, 1985). Una vez fijadas las piezas bucales se inicia la búsqueda de sangre,

durante este proceso se dañan capilares y vasos sanguíneos causando hemorragia y formándose así lagunas de alimentación (Mans, 2004).

El período de alimentación de *R. sanguineus* puede variar de días para el caso larvas a varias semanas en el caso de las hembras (Koch, 1982), dependiendo del estadio de desarrollo y el hospedero (Troughton, 2007). Todos los estadios se alimentan preferentemente de sangre de perro, aunque ellos se alimentaran de otros mamíferos si fuera necesario. Las larvas se alimentan de 3 a 7 días, las ninfas de 5 a 10 días, las hembras por varias semanas y los machos por períodos de tiempo más largos (Lord, 2014). Los lugares de preferencia para la fijación de *R. sanguineus* son: La cabeza (especialmente las orejas), zona interdigital, axilas, lomo y región inguinal (Dantas-Torres, 2010).

2.1.3.4 Reproducción

Una vez que *R. sanguineus* alcanza la madurez sexual se aparea únicamente en el hospedero. Aunque la ingestión de sangre es el mayor estímulo para la espermatogénesis en machos y la ovogénesis en las hembras, la hembra no se ingurgitará completamente si no llega a aparearse con el macho (Dantas-Torres, 2010).

Los adultos son frecuentemente encontrados fijados en pareja en el hospedero, el macho y la hembra se alimentan teniendo contacto sus superficies ventrales y en esa posición copulan (Feldman, 1970). El macho estimula la apertura genital de la hembra (gonoporo) insertando el quelícero en dicha estructura y poco después transfiere el espermátforo al gonoporo con ayuda de las piezas bucales, posteriormente pasa por el tracto genital de la hembra y llega al receptáculo seminal 24 horas después de la copula (Feldman, 1971).

Cuando el período de alimentación finaliza, la hembra ingurgitada se desprende, cae al suelo y después de un período de pre-ovoposición (que puede durar de días hasta algunas semanas) depositan sin interrupción de 1500 a 4000 huevos en promedio (Sirivastava, 1964). El período de ovoposición puede durar varias semanas y el número de huevos puestos por cada hembra está relacionado con el peso de la hembra y el tiempo del período de ovoposición (Koch, 1982).

Las hembras trepan las paredes y depositan los huevos dentro de grietas de las paredes, debajo de la cama de los perros (Walker, 2003) o incluso en lugares escondidos entre las rocas o dentro de la tierra para protegerlos de depredadores como arañas, aves y avispas (Dantas-Torres, 2010).

Mientras se realiza la ovoposición, la hembra pasa los huevos por encima de su área porosa, la cual es un área especializada ubicada en la parte dorsal de la base del capítulo, para cubrirlos con secreciones que los protegerán de la desecación (Lord, 2014). La incubación de los huevos dura de 6 días hasta algunas semanas y culmina con el nacimiento de las larvas hexápodos (Dantas-Torres, 2008).

2.1.3.5 Desarrollo

Las larvas necesitan un tiempo para endurecer su esqueleto quitinoso antes de buscar un hospedero y realizar la primera fijación sobre la piel del hospedero (Dantas-Torres, 2010). En un estudio realizado por Srivastava (1964), se observó que las larvas con menos de 7 días de nacidas eran incapaces de subirse a un hospedero y alimentarse de él.

Una vez que las larvas y ninfas ingurgitadas se alimentan completamente, se desprenden del hospedero y caen al suelo para buscar un lugar escondido para iniciar el proceso de muda (Dantas Torres, 2010). Usualmente las larvas y ninfas mudan en el mismo sitio donde las hembras depositan los huevos (Walker, 2003).

Antes de iniciar la muda, se produce primero un período de Pre-Muda que puede durar de días a semanas dependiendo del estadio de vida y condiciones climáticas. A temperaturas bajas las larvas y ninfas ingurgitadas pueden entrar en un estado fisiológico de Diapausa, mientras que a temperaturas más altas el período de muda se hace más corto (Koch, 1986).

La muda es regulada por hormonas y comienza con la ruptura de la antigua cutícula (Rees, 2004). Antes de emerger del viejo tegumento comienza el proceso de defecación, teniendo a la guanina como principal componente de las heces la cual es capaz de favorecer el proceso de agregación de garrapatas en algunas especies (Sonenshine, 2006). Aunque la guanina ha sido

identificada como una hormona que puede favorecer la agregación y acelerar el proceso de muda en las ninfas, aún no ha podido ser encontrada en *R. sanguineus* (Cancado, 2007).

2.1.3.6 Hospederos

El perro es el principal hospedero tanto en áreas urbanas como rurales para el cual *R. sanguineus* parece estar especializado (Szabó, 2001; O'Farril, 2005) y sirve de hospedero para todos los estadios de desarrollo (Walker, 2003). Sin embargo, *R. sanguineus* puede infestar una amplia variedad de hospederos domésticos y salvajes incluyendo bovinos, equinos, felinos, conejos, aves (Leguía, 1996), cabras (González, 2006), roedores (Tavares, 2014), marsupiales (Santa Cruz, 1998), tortugas (Keirans, 1985) e incluso al hombre (Dantas-Torres, 2006; Parola 2008).

La diferencia en la preferencia de hospedero parece estar relacionada con la disponibilidad de animales, de manera que si no hay perros en una determinada área *R. sanguineus* podría buscar otro tipo de mamíferos que parasitar (Lord, 2014). Asimismo, el parasitismo en mamíferos que no sean perros podría estar relacionado a presencia de caninos y ambientes severamente infestados, es decir varía de acuerdo a la población de garrapatas presente en un determinado lugar (Dantas-Torres, 2010).

El parasitismo en humanos puede ser causado por adultos o por formas inmaduras de *R. sanguineus* (Dantas-Torres, 2006; Serra-Freire, 2010). Parola (2008) demostró que existe una predisposición para el parasitismo en las personas cuando son expuestas a altas temperaturas y está relacionado al crecimiento de la población de garrapatas y la disponibilidad de hospederos humanos.

La carga de garrapatas infestando un perro puede estar influenciada por factores individuales del perro como la edad (Tinoco-Gracia, 2009), sexo (Silveira, 2009) y raza (Louly, 2007). Siendo más frecuente encontrarla en perros jóvenes, machos y de raza Cocker spaniel inglés.

La resistencia a las garrapatas en perros es medida comparando algunos parámetros biológicos de garrapatas ingurgitadas en perros que han sido infestados anteriormente y perros que nunca han sido infestados (Inokuma, 1997). Los perros desarrollan una inmunidad gradual que se manifiesta por una disminución del grado de infestación, menor tiempo de ingestión de

sangre, menor tasa de ovoposición y reducción en la viabilidad de las larvas (Leguía, 1996). Asimismo, Veronez (2010) demostró que existen cambios histológicos en garrapatas ingurgitadas que se alimentan de perros resistentes.

2.1.3.7 Epidemiología

R. sanguineus es una de las especies de garrapatas más ampliamente distribuidas en el mundo (Venzal, 2017). Se cree es nativa de África, pero fue distribuida a diversas partes del mundo con temperatura cálida y tropical gracias a la migración de personas y sus perros (Walker, 2003). La intensidad de la infestación por *R. sanguineus* en perros puede variar geográficamente y estacionalmente (Dantas-Torres, 2010).

Es encontrada comúnmente en ambientes de clima cálido, en perros, casas, perreras e incluso en vida salvaje (Lord, 2014). Esta garrapata se ha distribuido globalmente entre 50°N y 35°S y gracias a su asociación con el perro puede incluso sobrevivir en regiones climáticas de temperaturas frías (Ramírez et al., 2008).

R. sanguineus se ha establecido en América del Norte, Centro y Sur, India, África, Madagascar, China, Europa y otras áreas (Walker, 2003). En el Perú esta garrapata es prevalente en áreas de clima tropical y subtropical, habiéndose reportado en Lima, Piura, Huánuco, San Martín, Pucallpa (Leguía, 1996), Amazonas (Glenny, 2002) y Lambayeque (Nuntón, 2013).

La duración del ciclo biológico está estrechamente relacionada con la temperatura y humedad ambiental. A mayor temperatura y humedad relativa (HR), menor tiempo de desarrollo. Así a 28°C y una HR de 70%, el ciclo biológico completo se realiza entre 45 a 50 días, por ello la incidencia es más elevada en época de verano (Leguía, 1996). Al parecer existe una fuerte correlación entre el número de garrapatas y la temperatura ambiental, disminuyendo en meses de invierno y aumentando durante el verano (Dantas-Torres, 2010).

Estudios similares realizados en Perú muestran que con una temperatura ambiental entre 18°C y 26.7°C la prevalencia de *R. sanguineus* en perros fue de 30% (Estares, 1999) mientras que a 15.4°C en invierno la prevalencia de *R. sanguineus* fue de 2.8% (Bustamante, 1998),

notándose así el efecto de la temperatura sobre la prevalencia de este ectoparásito en su principal hospedero.

Asimismo, la ocurrencia estacional de *R. sanguineus* en perros fue examinada por Inokuma (1996) en Japón, encontrándose que las garrapatas desaparecieron de los perros cuando la temperatura fue menor a 15°C y que el periodo de oviposición bajo condiciones de laboratorio se prolongó cuando la temperatura decreció de 37°C a 23°C y fue extremadamente largo a 14°C.

2.1.3.8 Ciclo Biológico

R. sanguineus es una garrapata que requiere 3 hospederos, de la misma o diferente especie, para completar su desarrollo (Leguía, 1996). Esto significa que una vez alimentado, abandonará el hospedero para desarrollarse y mudar en los distintos estadios de vida, larva, ninfa y adultos (Lord, 2014).

La hembra fertilizada, después de la última succión de sangre en el hospedero se desprende y cae al suelo donde deposita sus huevos (Labruna, 2004) La garrapata inmadura que sale del huevo posee seis patas (Hexápoda) y recibe el nombre de Larva, pudiendo estas sobrevivir hasta 8 meses sin alimentarse (O’Farril-Nieves, 2005).

Las larvas hexápodas infestan al perro u otro hospedero y se alimentan de sangre por 3 a 7 días (Lord, 2014) para luego desprenderse y caer al suelo donde muda al estadio de ninfa en 3 a 4 semanas. Ésta presenta 8 patas (Leguía, 1996) y suben a la vegetación u otras superficies y esperan a tener contacto con un hospedero (O’Farril-Nieves, 2005). Una vez fijada al segundo hospedero succiona sangre por un período de 5 a 10 días (Lord, 2014), aunque pueden sobrevivir hasta 6 meses sin alimentarse (O’Farril-Nieves, 2005).

Posteriormente, caen al suelo donde mudan a adultos, machos y hembras, en un periodo de 2 a 26 semanas, aunque en condiciones favorables a los 63 días se pueden convertir en adultos (Labruna, 2004; Quiroz, 2005). Los adultos jóvenes pueden sobrevivir alrededor de 18 meses sin alimentarse (O’Farril-Nieves, 2005).

Machos y hembras infestan un tercer hospedero donde se realiza la cópula (Leguía, 1996). Las hembras pueden ingurgitarse en 7 días, pero pueden permanecer en el perro por 3 semanas

si es que no hay cópula, mientras que el macho puede permanecer por varios meses con varias cópulas repetidas (Walker, 2003).

El ciclo de vida de *R. sanguineus* puede completarse en 10 semanas (Walker, 2003) bajo condiciones ideales de temperatura y humedad. El período Prepatente fluctúa entre 45 a 450 días (Leguía, 1996). El número de generaciones de *R. sanguineus* por año puede variar de acuerdo a la región. Bajo condiciones favorables pueden completarse de 3 a 4 generaciones (Silveira, 2009).

2.1.3.9 Importancia en Medicina Veterinaria.

Las enfermedades transmitidas por garrapatas constituyen uno de los más grandes problemas en Salud Pública y Veterinaria que existen a nivel mundial (Álvarez, 2017). *Rhipicephalus sanguineus* está involucrado en la transmisión de agentes patógenos a los caninos tales como: *Ehrlichia canis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia gibsoni* y *Anaplasma platys* (Venzal, 2017).

La Ehrlichiosis canina es una infección que puede evolucionar a una forma crónica que cursa con alteraciones hematopoyéticas, principalmente trombocitopenia (Guerrero, 2016). Similares hallazgos como anemia además de la trombocitopenia son encontrados en casos de Babesiosis y Anaplasmosis canina. La Hepatozoonosis se caracteriza por mialgia con trastornos de locomoción, llegando a miositis crónica, debilidad y muerte del animal (Mateus, 2007).

Las garrapatas adquieren dichos microorganismos al alimentarse sobre animales infectados, por transmisión transtadial en la cual la transmisión de la infección se transfiere al siguiente estadio evolutivo (Ramírez, 2014) y por transmisión transovárica, es decir la hembra infectada transmite el agente a los huevos teniendo como consecuencia el nacimiento de larvas portadoras y vectores del agente infeccioso (Parola y Raoult, 2001).

Además de transmisión de microorganismos, los mecanismos de acción patógena ejercidos por las garrapatas sobre el hospedador son amplios y de varios tipos: Acción irritante, hematófaga, alérgica y tóxica, causando prurito, anemia, eritema y parálisis ascendente respectivamente (Leguía, 1996; Quiroz, 2005; Lorenzana 2005; Otranto, 2012).

2.1.3.10 Importancia en Salud pública.

Rhipicephalus sanguineus es un ectoparásito de significancia en Salud Pública y está involucrado en la transmisión de importantes patógenos humanos como es el caso de *Rickettsia rickettsii* (Dantas-Torres, 2006), *Rickettsia coronii* y *Rickettsia massiliae* (Venzal, 2017).

Dichos microorganismos son responsables de causar enfermedad en la población humana alrededor del mundo, por ejemplo, *Rickettsia coronii* es causante de la Fiebre manchada del Mediterráneo en el viejo mundo (Rovero, 2008) mientras que *Rickettsia rickettsii* es causante de la Fiebre manchada de las Montañas rocosas en América (Demma, 2005).

Rickettsia massiliae es también transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* y es un patógeno emergente a nivel mundial (Eremeeva, 2006), del cual se desconoce su potencial patógeno (Márquez, 2005) y presenta un único caso documentado en Argentina (García-García, 2010).

El cambio climático tiene un impacto en las garrapatas y la epidemiología de las enfermedades transmitidas por dichos vectores (Gray, 2013) debido a que la biología y la ecología de las garrapatas se encuentran bajo directa influencia de factores climáticos como temperatura y humedad (Dantas-Torres, 2010).

El calentamiento global puede favorecer el establecimiento de poblaciones de garrapatas en áreas libres de infestación y se ha especulado que el incremento de 2-3°C de temperatura de abril a Setiembre puede favorecer en el establecimiento de *Rhipicephalus sanguineus* en regiones del norte de Europa (Gray, 2013). Además, la exposición de *Rhipicephalus sanguineus* a altas temperaturas permite una fijación más rápida a humanos incrementando así el riesgo de transmisión de algunos patógenos como *Rickettsia coronii* en épocas de verano (Parola, 2008).

Los casos de parasitismo humano por *Rhipicephalus sanguineus* son esporádicos y están relacionado a factores como presencia de perros infestados, niveles altos de ambientes infestados (Dantas-Torres, 2006; Serra-Freire, 2010). Asimismo, las personas que mantienen un contacto estrecho con perros están en mayor riesgo de exposición a *Rhipicephalus sanguineus* (Louly, 2007).

De todo lo mencionado anteriormente se destaca que el calentamiento global podría afectar las poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* alrededor del mundo y la epidemiología de algunas enfermedades transmitidas por garrapatas (Parola, 2008).

2.1.3.11 Competencia Vectorial.

Como consecuencia de sus hábitos hematófagos, las garrapatas tienen un papel relevante en la transmisión de distintos microorganismos patógenos, muchos de los cuales constituyen los responsables de producir distintas enfermedades zoonóticas que afectan al hombre y a los animales domésticos y silvestres (Walker, 2003; Venzal, 2017). Este potencial vectorial se mide en términos de competencia vectorial. La competencia vectorial es la capacidad genética o habilidad intrínseca del vector para infectarse con un patógeno y posteriormente ser capaz de transmitirlo, la cual es evaluada en estudios de laboratorio (Márquez, 2005).

Existe diferencia en cuanto a la competencia vectorial mostrada por los dos linajes neotropicales de *Rhipicephalus sanguineus* s.l (Nava, 2015). De acuerdo a estudios moleculares realizados en *Rhipicephalus sanguineus* s.l en América Latina (Morales-Filho, 2011), las garrapatas de Sao Paulo-Brasil corresponden a las especies del linaje del Norte, mientras que las garrapatas del sur de Brasil, Argentina y Uruguay corresponden a las especies del linaje del Sur.

Por dicha razón un estudio experimental evaluó la competencia vectorial para *E. canis* de cuatro poblaciones neotropicales de *Rhipicephalus sanguineus* s.l mostrándose que las poblaciones de garrapatas de América tropical (Sao Paulo- Brasil) fueron vectores competentes de *E. canis*, pero no lo fueron las garrapatas del cono sur de Sudamérica (Argentina, Uruguay y el sur de Brasil). Basados en estos resultados se concluyó que la ausencia o escasez de casos de Ehrlichiosis monocítica canina por *E. canis* en el cono sur de Sudamérica es resultado de la incompetencia vectorial de *Rhipicephalus sanguineus* del linaje del Sur de dicha área geográfica (Morales-Filho et al, 2015).

Estos resultados son apoyados por los encontrados por Venzal en Uruguay en el 2007, en los que todas las garrapatas evaluadas fueron negativas a la presencia de *E. canis*. Asimismo, en Argentina se evaluó la infección natural de *Ehrlichia canis* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l pertenecientes al linaje del Norte y del Sur, mostrando que todas las garrapatas infectadas con *E. canis* y *A. platys* pertenecieron al linaje del Norte (Cicuttin, 2015).

La diferencia en la competencia vectorial de los dos linajes de *Rhipicephalus sanguineus* s.l expresada para *E. canis* podría también ocurrir para otros patógenos (Nava, 2012), por esta razón la identificación de los linajes del Norte y del Sur así como también la determinación de la competencia vectorial son de suma importancia para entender la epidemiología de las enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

2.2 Métodos de Identificación

2.2.1 Importancia de la Identificación exacta de las Garrapatas.

La identificación exacta de las especies de garrapatas es importante para el control de las enfermedades que transmiten y ha sido tradicionalmente logrado a través de criterios morfológicos (Mangold, 1998, Dantas-Torres, 2013). Sin embargo, la diferenciación de especies de garrapatas por criterios morfológicos puede ser difícil sobre todo cuando los especímenes se encuentran físicamente dañados, ingurgitados con sangre, en estadios inmaduros (Caporale, 1995), no presenten alguna estructura importante en la identificación o existen dificultades técnicas debidas a la falta de experiencia y capacitación para realizar la identificación morfológica (Takano, 2014).

La identificación y diferenciación de *Rhipicephalus sanguineus* de otras garrapatas cercanamente relacionadas ha sido realizada por lo general basado en características morfológicas como el tamaño, apertura genital, dimorfismo sexual y ciertas características del capítulo (Walker, 2003). En los últimos años el estado taxonómico de *Rhipicephalus sanguineus* ha estado en debate (Nava, 2015), sabiendo que es considerado un complejo de especies relacionadas basado en un enfoque morfológico tradicional (Dantas-Torres, 2010).

Las Identificación morfológica basadas en técnicas fenotípicas tienen considerables limitaciones para la precisa identificación y diferenciación de todos los miembros pertenecientes al complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l) (Dantas-Torres, 2008). Por otro lado, los métodos moleculares que emplean marcadores moleculares de ADN han probado ser herramientas valiosas que pueden superar dichas limitaciones y han sido usados para identificar y diferenciar especies de garrapatas (Szabó, 2005).

Además, los métodos moleculares han sido empleados para evaluar la resistencia a diversos acaricidas (Díaz, 2012), desarrollar vacunas (Perez-Perez, 2010), distinguir los Linages del Norte y Sur dentro del complejo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Szabó, 2005; Burlini, 2010; Moraes-Filho, 2011; Nava, 2012; Jones, 2017), así como también para evaluar la competencia vectorial a determinados agentes patógenos (Cicuttin, 2015; Moraes-Filho, 2015).

2.2.2 Identificación Molecular

La identificación exacta de especies es crucial debido a que representa la base para el establecimiento y desarrollo de estrategias de control y tratamiento contra las enfermedades transmitidas por garrapatas (Latrofa, 2013). Los métodos moleculares juegan un papel fundamental para la identificación de garrapatas y para realizarlo se emplean marcadores genéticos nucleares y mitocondriales.

2.2.2.1 ¿Marcadores genéticos Nucleares o Mitocondriales?

Muchos estudios han evaluado la idoneidad de un rango de marcadores moleculares para lograr una rápida y confiable identificación de especies de garrapatas dentro del complejo *Rhipicephalus sanguineus* s.l (Szabó et al, 2005; Burlini, 2010; Moraes-Filho, 2011; Nava, 2012).

Entre los marcadores moleculares genéticos más usados, los genes mitocondriales 16S rADN y 12S rADN ribosomal han demostrado ser precisos para la identificación de especies de varios especímenes *Rhipicephalus sanguineus* (Black, 1997; Beati y Keirans 2001; Nava, 2012), mientras que el gen nuclear 18S rADN ha sido usado para la diferenciación de familias, subfamilias y géneros (Mangold, 1998). Por otro lado, existe poca información disponible sobre la idoneidad de otros genes mitocondriales como la subunidad 1 del Citocromo C oxidasa (COI) (Murrel, 2000; Dantas-Torres, 2013) y genes nucleares como la Región espaciadora transcrita interna del gen nuclear ribosomal 2 (ITS-2) (Barker, 1998).

Latrofa en el 2013 confirmó la idoneidad de los marcadores mitocondriales como el gen 16S, 12S y COI frente al gen nuclear ITS2 para una confiable identificación de garrapatas

dentro del género *Rhipicephalus*. La idoneidad de los genes mitocondriales probablemente esté directamente relacionada con características peculiares de estos marcadores genéticos, como las tasas de mutación relativamente altas, el alto contenido de A + T y la herencia materna sin eventos de recombinación (White, 2008).

2.2.2.2 Revisión de Marcadores moleculares.

A continuación, realizaremos una breve descripción de los marcadores moleculares mitocondriales (16S rADN, 12S rADN y Cox 1) y nucleares (18S rADN y ITS 2) más utilizados para la identificación de garrapatas, diferenciación de especies y establecer relaciones filogenéticas.

a) 16S rADN

El gen mitocondrial 16S rADN ha sido utilizado ampliamente para la identificación y estudios de filogenia de garrapatas duras y blandas (Black y Piesman, 1994) y permite una buena diferenciación de especies debido a que este gen presenta gran cantidad de regiones variables (Takano, 2014). Este gen parece ser un buen marcador para el establecimiento de relaciones genéticas entre especies de garrapatas cercanamente relacionadas, pero no parece ser útil para comparar taxas distantemente relacionadas (Black y Piesman, 1994; Norris et al. 1999). Esto podría deberse al alto nivel de homoplasia encontrado en genes que evolucionan rápidamente como los genes mitocondriales (Simon et al. 1994).

En un estudio comparativo para la discriminación de garrapatas se observó que el gen 16S rADN permitía desarrollar primers más eficientes, la tasa de amplificación era más alta y sus fragmentos de secuencia amplificados eran más fáciles de secuenciar en una sola reacción frente a otros marcadores moleculares (Jizhou, 2014). Estos resultados respaldan los encontrados en un análisis comparativo de marcadores mitocondriales para identificar especies del género *Rhipicephalus*, donde se observó que el gen 16S rADN alcanzaba un mayor porcentaje de identificación intra-especie para *Rhipicephalus sanguineus* (Erster, 2013).

Asimismo, el gen 16S rADN ha sido útil identificar los linages del Norte y Sur de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en América (Szabó, 2005; Moraes-Filho, 2011; Nava 2012), Europa (Dantas-Torres, 2017) y África (Chitimia-Dobler, 2017) y establecer relaciones filogenéticas con patrones de distribución geográfica. Además, las secuencias registradas para este gen en el GenBank son más abundantes que otros genes (Takano, 2014).

b) 12S rADN

Norris et al en 1999 sugiere que este gen puede ser adecuado para resolver relaciones en un nivel infraespecífico o entre taxas cercanamente relacionadas debido a su alto contenido de AT del genoma mitocondrial causando una larga cantidad de homoplasia.

Jizhou en 2014 mostró que el fragmento amplificado del gen 12S rADN fue corto (menos de 450 pares de base) y sin heterozigosidad, haciéndolo fácil para obtener secuencias exactas en una sola reacción. Además, este gen parece ser prometedor como herramienta para examinar relaciones entre ramas de filogenia recientemente divergidas de garrapatas duras y se usó para demostrar que el género *Boophilus* surgió dentro del género *Rhipicephalus* (Beati y Keirans, 2001).

Finalmente, un fragmento del gen 12S rADN ha sido usado para detectar la presencia de los linajes del Norte y Sur de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en Norte América (Jones, 2017) y determinar relaciones evolutivas entre poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de África con especímenes de Europa y América (Chitimia-Dobler, 2017).

c) 18S rADN

Crampton (1996) secuenció 254 pares de base del 18S rADN de varias especies de garrapatas confirmando que este gen es adecuado para la filogenia al nivel de familia y subfamilia debido a que es una región más conservada (Palumbi, 1996) y por lo tanto menos sujeta a homoplasia en comparación con el gen 16S rADN (Simon, 1994).

Black en 1997 mostró que las relaciones filogenéticas entre subfamilias de garrapatas usando el gen 18S rADN se parecía sustancialmente a la filogenia originalmente basada en criterios morfológicos a diferencia de la filogenia basada en el gen 16S rADN (Black y Piesman, 1994).

Por otro lado, Mangold en 1998 demostró que este gen es un buen marcador para la diferenciación supraespecífica, así como la agrupación de género entre garrapatas duras, estos resultados apoyan lo encontrado por Abdullah (2016) y Jizhou (2013) en los que este gen podía discriminar garrapatas a nivel de género.

d) Citocromo c oxidasa subunidad I (COI)

El citocromo c oxidasa subunidad I (COI) es considerado como el marcador de código de barras de ADN preferido para animales (Miller, 2007). Sin embargo, las secuencias de COI de garrapatas disponibles en Genbank no satisfacían la demanda para la discriminación a nivel de especie (Song et al., 2011).

Por dicha razón, COI ha sido usado para desarrollar un sistema de código de barras de ADN para la identificación de especies de Ixodida con éxito debido a que los niveles de divergencia entre individuos de la misma especie son usualmente más bajos que los pertenecientes a especies cercanamente relacionadas (Jizhou, 2013; Zhang, 2014). Asimismo, se evaluó cuatro fragmentos de ADN (COI, 16S rADN, 12S rADN, ITS2) para identificar especies de garrapatas duras (Jizhou, 2014), mostrando que, como código de barras estándar de ADN, COI debería ser la primera opción para la identificación de especies.

Por otro lado, COI fue usado para identificar especies del género *Rhipicephalus* (Erster, 2013; Latrofa, 2013) y mostrar la diversidad genética de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Nuevo y Viejo mundo incluyendo la presentación del linaje del Norte y Sur (Dantas-Torres, 2013).

e) Región espaciadora transcrita interna del gen nuclear ribosomal (ITS 2)

La región espaciadora transcrita interna del gen nuclear ribosomal (ITS 2) es una región no codificante, que al no tener función sus secuencias están bajo poca presión de selección y puede acumular sustituciones rápidamente que podría hacerlo útil para la discriminación de especies cercanamente relacionadas (Cruickshank, 2002).

Zhaler (1997) usó 250 pares de base de ITS2 y sugirió que *Rhipicephalus sanguineus* con *Rhipicephalus turanicus* y *Rhipicephalus pumilio* con *Rhipicephalus camicasi* pertenecen respectivamente a la misma especie debido a que cada par de dichas especies tenían secuencias idénticas. Sin embargo, Barker (1998) pudo distinguir poblaciones y especies de *Boophilus* y *Rhipicephalus*, logrando incluso distinguir *Rhipicephalus sanguineus* de *Rhipicephalus turanicus* usando el gen entero ITS2 mostrando así su utilidad para distinguir especies de *Rhipicephalus* que son difíciles de distinguir morfológicamente mencionando que los resultados obtenidos por Zhaler (1997) se deben al posible uso de regiones de ITS2 menos variables que otras partes del gen.

Contrariamente a lo encontrado por Barker (1998), Latrofa (2013) mostró una baja divergencia genética interespecífica de ITS2 para diferenciar especies del complejo *Rhipicephalus sanguineus*, apoyando lo propuesto por Zhaler (1997) al señalar la insuficiencia de este marcador para la diferenciación de especies, pero mostrando idoneidad para la identificación de especies lejanamente relacionadas como *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus muhsamae*.

Por último, en un estudio realizado por Jizhou (2014), ITS2 mostró una divergencia genética interespecífica más alta para especies de garrapatas que eran genéticamente distantes y una divergencia genética más baja para especies que eran cercanamente relacionadas cuando se le comparó con COI, 12S rADN y 16S rADN e incluso se señala la posible idoneidad de ITS2 para identificación de especies del género *Ixodes*, pero no para el género *Rhipicephalus*.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Diseño de estudio

El estudio consistió en identificar morfológicamente mediante el uso de claves taxonómicas y mediante la técnica molecular de PCR y secuenciamiento genético las garrapatas de perros con Ehrlichiosis en el distrito de Chiclayo, Lambayeque, Perú.

3.2 Lugar de ejecución y período de estudio

El departamento de Lambayeque tiene una superficie de 14,231.30 km² y abarca 3 provincias en su jurisdicción: Provincia de Chiclayo, Provincia de Lambayeque y Provincia de Ferreñafe. El estudio se realizó en el distrito de Chiclayo (Provincia de Chiclayo), llevando a cabo el muestreo durante los meses de enero a abril del año 2016 con una temperatura ambiental entre 27°C y 35°C y una humedad relativa de 78%.

3.3 Descripción y tamaño de muestra

Las garrapatas que fueron incluidas en el muestreo provenían de perros con Ehrlichiosis. La obtención de la población de garrapatas se realizó de 2 maneras:

1. Se realizó 3 campañas de descarte/control de Ehrlichiosis. Con la ayuda de la Asociación “Refugio Animal” ubicada en el distrito de Chiclayo se llevaron a cabo dichas campañas dirigidas hacia las personas que tienen animales con signos compatibles con Ehrlichiosis (Epistaxis, petequias, depresión, anorexia, fiebre) o si tiene presencia de garrapatas con el objetivo de hacer el descarte de la enfermedad mediante el diagnóstico hematológico (resultados de hemograma y observación de mórulas microscópicas), historial clínico y signos compatibles. Asimismo, la campaña también estuvo dirigida a las personas que tienen perros con diagnóstico de Ehrlichiosis o que han presentado la enfermedad en un lapso no mayor a 2 años (etapa subclínica). Las garrapatas sometidas al estudio se colectaron de los perros que fueron diagnosticados con Ehrlichiosis durante la campaña o de los perros que ya tenían diagnóstico de la enfermedad.
2. Realizando el diagnóstico de Ehrlichiosis de animales sospechosos a la enfermedad en el Centro Veterinario “Más que patas” ubicado en Los Cerezos 110 – Urbanización Las Delicias (Chiclayo). De igual manera se colectó las garrapatas de los animales diagnosticados en el centro veterinario durante el tiempo de muestreo.

3.4 Materiales, reactivos y equipos.

- 2 pinzas curva punta roma.
- 2 pinzas entomológicas.
- Crioviales tapa rosca.
- Crioviales estériles.
- 5 Alcohol 70°.
- 3 Alcohol 96°.
- Estereoscopio.
- Etanol Absoluto 150 ml.
- Etanol Molecular 250 ml.
- Guantes de látex.
- Guantes de Nitrilo.
- TEN buffer.
- SDS 1%.
- Proteinasa K.
- Acetato de Amonio.
- Centrífuga Vacuum.

- Vortex.
- Tubos de PCR 0.2 ml.
- Pipetas.
- Microtubos 1.5 ml.
- GoTaq® G2 Green Master Mix.
- Termociclador Applied Biosystems.
- Agarosa 100g.
- Buffer TAE.
- Bromuro de Etidio.
- Marcador Peso Molecular LADDER.
- Cámara de electroforesis.
- Transiluminador de luz ultravioleta.
- Campana de campo oscuro.

3.5 Colecta de Garrapatas

Debido a la habilidad de las garrapatas para transmitir una variedad de enfermedades a los humanos y animales, especialmente después de un prolongado proceso de alimentación de sangre, la extracción rápida y segura es un método importante para prevenir la transmisión de muchos patógenos (Duscher, 2012). Se colectaron un total de 297 garrapatas de 74 perros siguiendo la técnica de Needham (1985):

- Se usaron pinzas curvas de punta roma (previamente las manos estuvieron protegidas con guantes). El uso de este tipo de pinza se basó en su mayor facilidad de uso, menor daño al cuerpo de la garrapata y menor daño a la piel del hospedero (Bowles, 1992)

- Se sujetó la garrapata lo más cerca de la superficie de la piel como sea posible y se tiró hacia arriba ejerciendo una constante presión uniforme. No se torció o tiró con mucha fuerza a la garrapata porque esto podía causar que las piezas bucales se rompan dejando el hipostoma y los quelíceros junto con el collar de cemento en la piel.

- Se tuvo cuidado de no apretar, aplastar o perforar el cuerpo de la garrapata ya que permitiría la salida de sus fluidos (saliva, hemolinfa, contenido intestinal) que pueden contener agentes infecciosos (Barker, 1973).

-No se manejó la garrapata con las manos debido a que los agentes infecciosos pueden entrar a través de las membranas mucosas o heridas en la piel. Esta precaución se dirige particularmente a las personas que remueven las garrapatas de los animales domésticos con las manos desprotegidas. Después de retirar la garrapata, se desinfectó a fondo el sitio de la mordedura y se procedió al lavado de las manos con agua y jabón.

Las garrapatas fueron colectadas de todo el cuerpo del animal haciendo énfasis en zonas como la oreja, axila y región interdigital ya que son los lugares de adherencia preferidos por las garrapatas (Dantas-Torres, 2010).

3.6 Conservación e Identificación de las muestras

Una vez colectadas las garrapatas, se conservaron en crioviales de tapa rosca con alcohol al 70% y posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4°C. La conservación de garrapatas en alcohol y almacenamiento en refrigeración es un método muy efectivo para la preservación de ADN de garrapatas para procedimientos moleculares (Mtambo, 2006).

Además, el etanol es considerado uno de los métodos más efectivos para la preservación de insectos debido a su capacidad de deshidratar el medio, coagular proteínas, detener la actividad de las enzimas nucleasas (King, 2004) y presentar mayor disponibilidad y menor costo en comparación con otros reactivos (Fukatsu, 1999; Tayutivutikul, 2003).

Los crioviales fueron rotulados e identificados con el nombre del canino, fecha de la recolección y lugar de muestreo. Asimismo, se anotó datos importantes como edad, sexo y antecedentes de enfermedad del perro en una base de datos.

3.7 Procesamiento de las muestras

3.7.1 Identificación Morfológica

La identificación morfológica de las garrapatas se realizó bajo lupa estereoscópica y microscópica identificándose el género, especie, sexo y estadio evolutivo de los especímenes en el Laboratorio de Epidemiología y Economía de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Los especímenes fueron sometidos a

un proceso de aclaramiento tisular con Hidróxido de potasio y también observados directamente bajo el estereoscopio y microscopio realizándose la identificación morfológica siguiendo las claves taxonómicas de Keirans y Litwak (1989) (Apéndice 1) y Quiroz (2008).

Clave para la clasificación de los géneros en estado adulto de *Ixodidae* y *Argasidae* (Quiroz, 2015).

1. Surco anal es anterior al ano (Prostriata), es inornado, no tiene ojos ni festones.....Género: *Ixodes*.
El surco anal es posterior o está ausente, puede ser ornado o inornado.....Continuar en el punto 2
2. El segundo segmento de los palpos se proyecta más allá de los márgenes laterales de la base del capítulo. No tiene ojos.....Género: *Haemaphysalis*.
El segundo segmento de los palpos no se proyecta más allá de los márgenes laterales de la base del capítulo. Generalmente, tiene ojos.....Continuar en el punto 3
3. La base del capítulo es hexagonal y generalmente están inornados.....4
La base del capítulo no es hexagonal dorsalmente, pueden estar ornados o inornados.....Continuar en el punto 7
4. Tiene festones, la placa estigmática tiene forma de coma o subtriangular. La coxa I tiene una hendidura profunda.....5
No tienen festones, las placas estigmáticas son ovales y la coxa I no tiene hendidura profunda en las hembras.....Continuar en el punto 6
5. Los machos tienen escudos adanales y generalmente también accesorios. La coxa IV del macho es de tamaño normal. El segmento I de los palpos no tiene espolón dorsal.....Género: *Rhipicephalus*.
Los machos no tienen placas adanales ni accesorias. La coxa IV del macho está muy aumentada de tamaño. El segmento I de los palpos tiene espolón dorsal.....*Rhipicentor*
6. Los palpos son cortos, pero los bordes dorsal y lateral no. Los machos tienen patas normales.....*Boophilus*

Los palpos son cortos, pero los bordes dorsal y lateral no. Los machos tienen grandes segmentos en las patas.....*Margaropus*

7. Los palpos son cortos y el segundo segmento no es más largo que ancho. La base del capítulo es rectangular.....Género: *Dermacentor*

Los palpos son largos, el segundo segmento de los palpos tan largo como ancho. La base del capítulo es de forma variable, generalmente subtriangular o subrectangular dorsalmente.....Continuar en el punto 8

8. Sin ojos, son parásitos de reptiles.....*Aponomma*
Con ojos.....Continuar en el punto 9

9. El escudo generalmente es ornado, los festones están bien desarrollados. Los machos no tienen placas adanales, accesorias ni subanales.....Género: *Amblyomma*.
El escudo es inornado, los festones están poco desarrollados. Los machos tienen placas adanales, accesorias y subanales.....*Hyalomma*

Clave para la clasificación de los géneros de la familia *Argasidae*

1. El margen del cuerpo es delgado y agudo con una sutura que forma una línea que separa la cara dorsal y la ventral.....*Argas*
Sin sutura lateral.....Continuar con el punto 2

2. Presencia de una falsa placa dorsal anterior.....*Nothoaspis*
Ausencia de una falsa placa dorsal.....Continuar con el punto 3

3. El tegumento de las ninfas está cubierto con espinas. Los adultos tienen el tegumento granular y el hipostoma poco desarrollado.....*Otobius*
El tegumento es mamilado o tuberculado, sin espinas, hipostoma no vestigial.....Continuar con el punto 4

4. Tegumento tuberculado, hipostoma ancho en la base en forma de cuchara.....*Antricola*
Tegumento mamilado o similar, hipostoma de varias forma pero nunca como cuchara.....*Ornithodoros*

3.7.2 Identificación Molecular

Del total de garrapatas identificadas morfológicamente, 9 especímenes fueron seleccionados para identificarlos mediante procedimientos moleculares. Con el fin de evitar la contaminación de las muestras se hizo énfasis en las siguientes medidas de laboratorio: Utilización constante de guantes y mascarilla, así como de material desechable estéril y descontaminación periódica del material no desechable mediante su limpieza con etanol al 70% y posterior irradiación con luz UV. Dichas medidas se realizaron en cada una de las etapas del proceso (Extracción de ADN, preparación de las mezclas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa y análisis electroforético).

3.7.2.1 Extracción de ADN

A continuación, se detallará el protocolo de extracción de ADN elaborado por Kelehear et al (2013) y modificado por Gómez (2017).

-Se usó una pequeña muestra de tejido preservada en etanol absoluto o molecular. Se secó la muestra al aire libre, en una estufa o con ayuda de una centrífuga Vacuum. Luego se incubó toda la noche a 56°C (baño María) en un vial eppendorf con 100 ul de TEN buffer (404 mM Tris/ HCL; 20 mM EDTA, Ph 7.2), 1% SDS y 0.2 mg/mL de proteinasa K. (56 °C x 12 horas) (Buffer TEN + 10 ul proteinasa K 40 mg/ul).

-A esto, se agregó 75 ul de acetato de amonio (3M), se homogenizó la muestra en un vortex y luego se sedimentó la muestra con ayuda de una microcentrífuga. La muestra se enfrió a -80°C durante 10 minutos. Luego se centrifugó a velocidad máxima (14 000 g x 5 min).

-El sobrenadante fue pasado a un nuevo vial de 2 ml (eppendorf) y se añadió 2 volúmenes de etanol, se mezcló la muestra agitándolo 5 veces con los dedos, luego se enfrió a -80°C por 10 minutos y se centrifugó como antes (14 000 g x 10 minutos). Luego se descartó el sobrenadante.

-El sedimento (pellet) se lavó dos veces en etanol al 70% (175 ul), centrifugando cada vez la muestra a 14 000 g x 10 min. Luego la muestra se secó con ayuda de una centrífuga Vacuum (vacío-30 min) y se resuspendió en 100 ul de ddH₂O o buffer DES y se esperó 10-15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra de ADN se rotuló y se almacenó en congelación.

3.7.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación fueron realizadas en un volumen total de 50 μ l bajo condiciones completa de asepsia. Cada tubo de PCR contenía una mezcla de 1.3 μ l de cada primer, 25 μ l de 2x GoTaq Green PCR master mix (2X Buffer pH 8.5, 400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP and 3mM MgCl₂), 18.4 μ l de Agua molecular libre de nucleasas y finalmente 4 μ l de ADN genómico para completar el volumen total de las reacciones. Asimismo, junto a las reacciones de amplificación se incluyó un control negativo, en la que en la mezcla de reacción el ADN problema era sustituido por el mismo volumen de agua. La preparación de las mezclas de reacción y la incorporación final del ADN se llevaron en una cámara de flujo laminar dotada de luz ultravioleta.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador (Applied Biosystems) siguiendo el siguiente perfil de ciclo: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de Desnaturalización de 95°C por 30 segundos, Alineación a 50°C por 30 segundos y Extensión a 72°C por 40 segundos; y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

3.7.2.3 Electroforesis en Agar Gel

Los productos del PCR fueron examinados por medio de una Electroforesis en Agar gel. Para ello se preparó 1.5 g de Agarosa (1.5%) disuelta en 100 ml de buffer TAE a una temperatura entre 70-80°C, agregando 2 μ l de Bromuro de Etidio (10mg/ml) a la mezcla antes de su gelificación por 45 minutos a temperatura de 22°C. La mezcla se solidificó en la cámara de electroforesis y se agregaron 8 μ l del producto amplificado de PCR y 5 μ l de un marcador de Peso Molecular Ladder de 100 pares de base en cada celda del gel.

Una vez que el gel se solidificó, se conectó a una fuente de poder de 100 voltios a la cámara de electroforesis produciendo la migración de las muestras de ADN en dirección del cátodo al ánodo en un tiempo de 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo establecido se colocó el gel en el Transiluminador de Luz Ultravioleta (Cleaver Cientific) para realizar la lectura y se tomó la foto de las bandas de ADN en la Campana de campo oscuro adaptada a una cámara digital.

3.7.2.4 Secuenciamiento de los productos obtenidos del PCR

Los productos de amplificación del PCR fueron purificados y sometidos a secuenciamiento genético para lo cual fueron remitidos a la empresa Macrogen en Korea. La empresa Macrogen utiliza el sistema ABI Prism el cual tiene una metodología de secuenciamiento genético basada en el método didesoxi de Sanger.

3.7.2.5 Análisis de secuencias

Las secuencias de los nucleótidos obtenidos del gen 16SrADN de cada garrapata fueron alineadas, ensambladas y corregidas usando el programa ChromasPro. Posteriormente las secuencias fueron comparadas con las referencias de secuencias provenientes de la base de datos del GenBank (Cuadro 1), usando el BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Esta base de datos contiene más de 100.000 millones de pares de bases de información y permite búsquedas en línea en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>. El análisis filogenético se realizó usando el Programa MEGA7, midiendo la distancia evolutiva inferida desde la secuencia de nucleótidos. Las distancias genéticas fueron calculadas a través del método "neighbor-joining" con la distancia de 2-parámetros de Kimura. Todas las secuencias obtenidas fueron inscritas en el GenBank.

Cuadro 1 Datos de los especímenes *Rhipicephalus sanguineus* s.l incluidos en el análisis de las secuencias del gen 16S rADN

N°	Código	Localidad	País	Coordenadas geográficas	
				Latitud	Altitud
1	R.sanguineus_GU553074_A_Brazil ^b	Sinop-MT	Brasil	11°51´S	55°30´O
2	R.sanguineus_GU553075_B_Brazil ^b	Jaboticabal-SP	Brasil	21°15´S	48°17´O
3	R.sanguineus_GU553076_C_Colombiab ^b	Los Córdoba-Córdoba	Colombia	08°54´N	76°21´O
4	R.sanguineus_GU553077_D_Chile ^b	Viña del Mar	Chile	33°00´S	71°30´O
5	R.sanguineus_GU553084_E_Uruguay ^b	Montevideo	Uruguay	14°51´S	56°10´O
6	R.sanguineus_GU553078_F_Argentina ^b	Rafaela-Santa Fe	Argentina	31°15´S	61°29´O
7	R.sanguineus_GU553079_Sudafrica ^b	Dato no disponible	Sudáfrica	-	-
8	R.sanguineus_GU553081_Espana ^b	Dato no disponible	España	-	-
9	R.sanguineus_GU553083_Italia ^b	Dato no disponible	Italia	-	-
10	Sample78 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
11	Sample80 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
12	Sample81 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
13	Sample82 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
14	Sample83 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
15	Sample84 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
16	Sample85 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
17	Sample86 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O
18	Sample87 ^a	Chiclayo-Lambayeque	Perú	6°46´S	79°50´O

^a secuencias obtenidas en este estudio. ^b secuencias obtenidas del GenBank

IV. RESULTADOS

4.1 Identificación Morfológica

Las 297 garrapatas fueron identificadas como *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Se encontraron 176 Hembras y 123 Machos. La clasificación por sexo y estadio evolutivo se muestra en el siguiente cuadro 2.

Cuadro 2 Clasificación por sexo y estadio evolutivo de *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

Especie	Larvas	Ninfas	Adultos	
			Machos	Hembras
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l	0	1	121	175

Los especímenes adultos (Machos y hembras) presentaron las siguientes características morfológicas: Presencia de capítulo desde una vista dorsal (Figura 1), surco anal posterior al ano (Figura 2), segundo segmento del palpo sin proyección lateral hacia el margen del capítulo, ojos presentes, presencia de festones, base del capítulo hexagonal, piezas bucales pequeñas (Figura 3), palpos tan o más largos que la base

del capítulo o el hipostoma, coxa I profundamente hendida (Figura 4), placa espiracular en forma de coma (Figura 5).

El escudo quitinoso en los machos se extendía en un 80-100% de la superficie dorsal, mientras que en las hembras sólo cubría la mitad de la superficie (Figura 6). Además de las características mencionadas anteriormente, los Machos adultos presentaban placas adanales y placas accesorias, dichas estructuras estaban ausentes en las hembras.

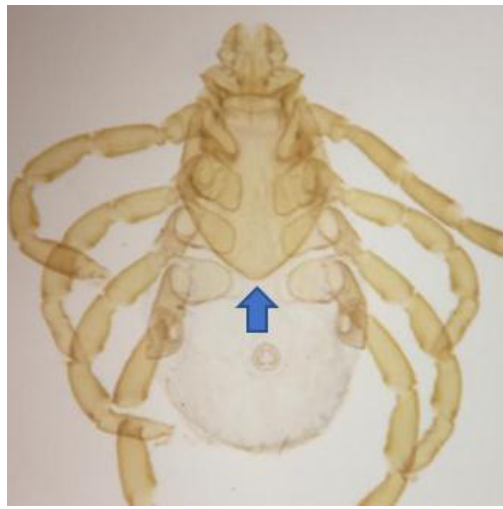


Figura 1. Presencia de capítulo y de escudo quitinoso (flecha azul).



Figura 2. Vista ventral. Presencia de surco anal posterior (flecha roja).



Figura 3. Vista dorsal. Piezas bucales pequeñas. Segundo segmento del palpo sin proyección lateral y ambos palpos no son más largos que la base del capítulo (flecha azul). Base del capítulo hexagonal (flecha roja).

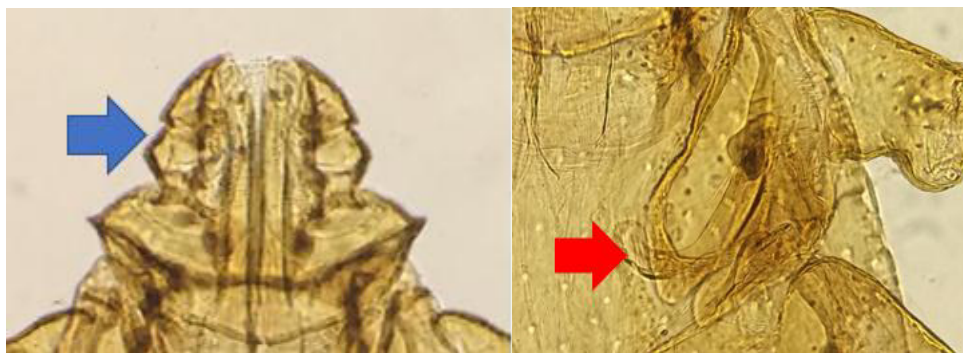


Figura 4. Vista ventral. Palpos más largos que el hipostoma (flecha azul), presencia de coxa dividida del primer par de patas (flecha roja).



Figura 5. Vista ventral. Placa espiracular en forma de coma (flecha roja)

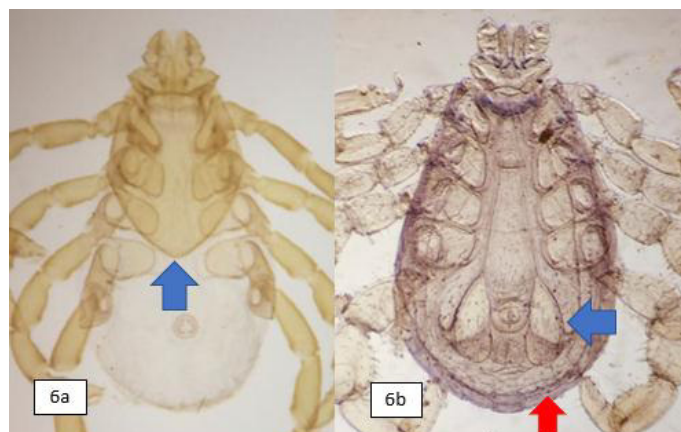


Figura 6. Escudo quitinoso cubriendo la superficie dorsal en un 50% en un espécimen hembra (6a, flecha azul) y 100% (6b, flecha roja) además de presentar un par de placas adanales (6b, flecha azul) en un espécimen macho de *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

4.2 Identificación Molecular

Productos de amplificación del gen 16S rADN obtenidos de 9 garrapatas identificadas morfológicamente como *Rhipicephalus sanguineus* s.l del distrito de Chiclayo, Lambayeque-Perú (Figura 8) fueron secuenciados y alineados. El análisis de las secuencias permitió confirmar la identificación de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. de las 9 muestras. Dichas secuencias presentaron una divergencia genética intraespecífica de 0%, es decir sus secuencias fueron totalmente idénticas.

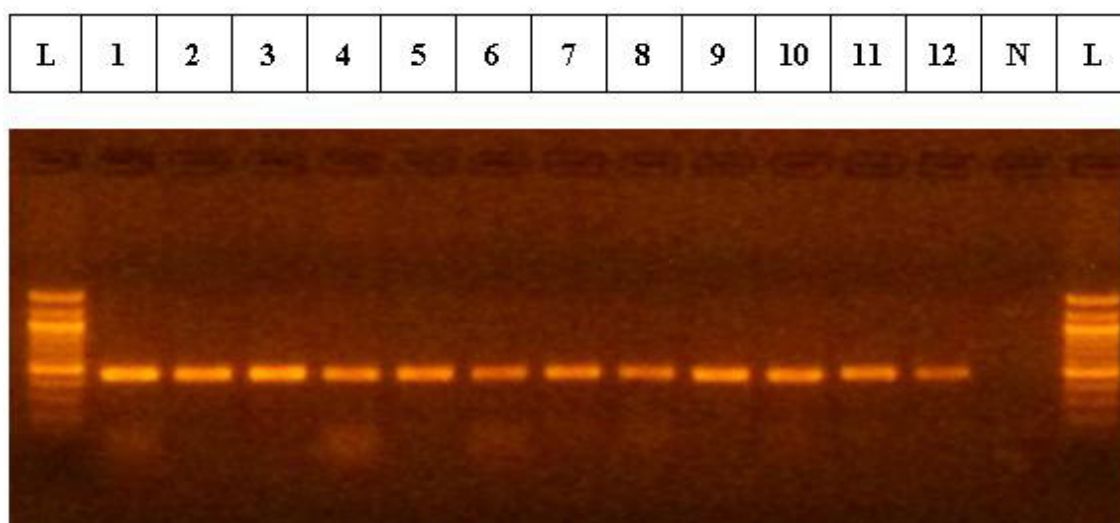


Figura 7. Productos de amplificación del gen 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en gel de agarosa al 1.5%. Las muestras fueron positivas con un tamaño molecular de 450 pares de base. L: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de base, N: Control negativo.

Asimismo, dichas secuencias obtenidas fueron alineadas con las secuencias obtenidas del GenBank (Figura 8).

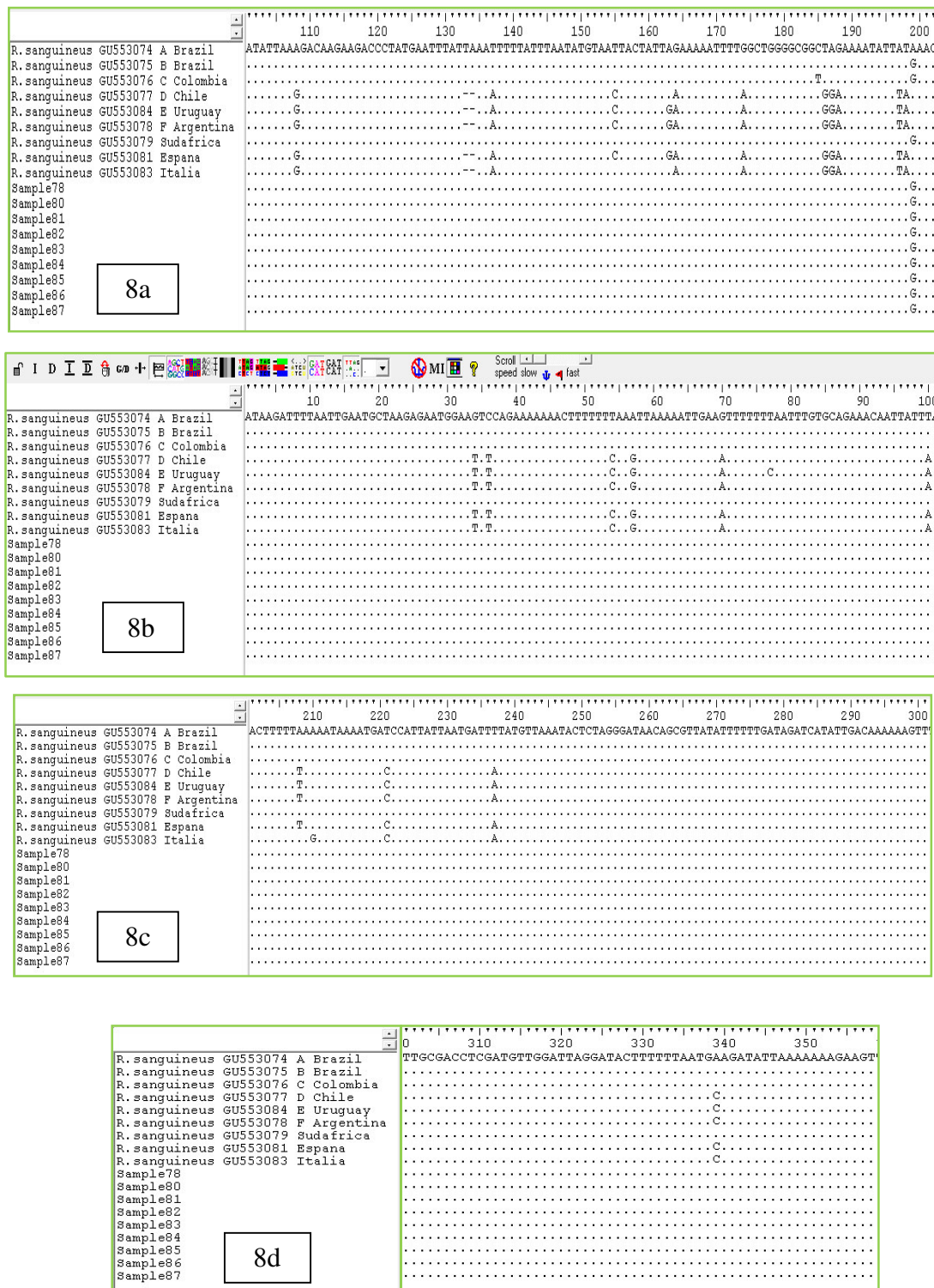


Figura 8. a, b, c y d. Alineación de secuencias de nucleótidos del gen 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Brasil, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y las muestras obtenidas en Perú (Sample 78-87).

Las diferencias entre secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y Perú iban desde 0 hasta 7.1% (Cuadro 3). Las diferencias entre las secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia (pertenecientes al conocido Linaje del Norte) fueron de 0.3-0.6%, mientras que las diferencias entre las secuencias de Chile, Uruguay, Argentina (pertenecientes al Linaje del Sur) fueron de 0.3-0.6%. Por otro lado, las secuencias de los países pertenecientes al Linaje del Norte y Linaje del Sur diferían de 5.8-7.1%.

Cuadro 3 Matriz de divergencia intraespecífica absoluta (% de diferencia de nucleótidos) de secuencias parciales de 358 pares de base del gen mitocondrial 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l

	Secuencias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Brasil A	-									
2	Brasil B	0.3	-								
3	Colombia	0.6	0.3	-							
4	Chile	5.8	6.1	6.5	-						
5	Uruguay	6.5	6.8	7.1	0.6	-					
6	Argentina	6.1	6.5	6.8	0.3	0.3	-				
7	Sudáfrica	0.3	0	0.3	6.1	6.8	6.8	-			
8	España	6.1	6.5	6.8	0.3	0.3	0.0	6.5	-		
9	Italia	5.5	5.8	6.2	0.8	1.4	1.1	5.8	1.1	-	
10	Perú	0.3	0	0.3	6.1	6.8	6.5	0.0	6.5	5.8	-

Las diferencias entre las secuencias del Perú y de países del Linaje del Norte fueron de 0-0.3%, siendo las secuencias de Perú totalmente idénticas a las de Brasil B, mientras que las diferencias con las secuencias de países del Linaje del Sur fueron de 6.1-6.8%.

En relación con las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* de España, éstas difieren de 6.1-6.8% de las secuencias del Linaje del Norte y de 0-0.3% de las secuencias del Linaje del Sur. Las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* de Italia difieren de 5.5-6.2% de las secuencias del Linaje del Norte y de 0.8-1.4% de las secuencias del Linaje del Sur. La divergencia genética mostrada entre las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* de Sudáfrica con las secuencias del Linaje del Norte y Linaje del Sur fueron de 0-0.3% y 6.1-6.8% respectivamente.

La divergencia genética intraespecífica mostrada por las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú y las secuencias europeas de España e Italia fueron de 5.8% y 6.5% respectivamente. Por otro lado, las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú fueron 100% idénticas con las de secuencias de Sudáfrica. Los valores absolutos de divergencia genética entre las secuencias parciales del gen mitocondrial 16S rADN son mostrados en el cuadro.

El análisis filogenético inferido por Neighbor-joining generó un árbol que segregó las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en dos distintas clases: Una representada por las secuencias de Brasil A, Brasil B, Colombia (Linaje del Norte), Sudáfrica y Perú y una segunda clase representada por las secuencias de Chile, Uruguay, Argentina, España e Italia (Figura 9).

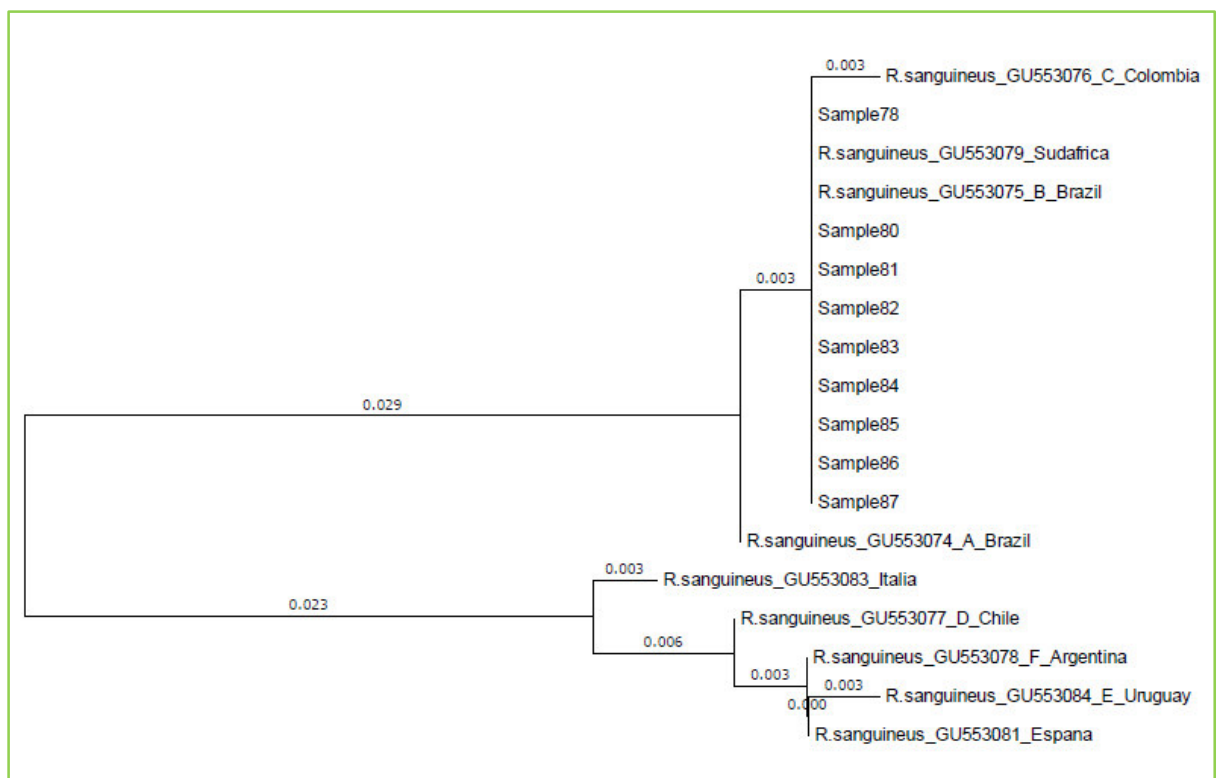


Figura 9. Árbol filogenético Neighbor-joining usando el parámetro de distancia Kimura 2 de secuencias parciales del gen 16S rADN (358 pares de base) de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Brasil, Colombia, Chile, Uruguay, Argentina, Sudáfrica, España, Italia y las muestras obtenidas en Perú (Sample 78-87).

V. DISCUSIÓN

En este estudio 297 garrapatas fueron identificadas morfológicamente como *Rhipicephalus sanguineus* s.l. Esta especie es la más ampliamente distribuida a nivel mundial (Walker, 2003) gracias a su relación con humanos y perros, siendo este último el principal hospedero (Dantas-Torres, 2008). Esto apoya nuestros resultados al ser la única especie de garrapata encontrada de los 74 perros muestreados a pesar de haberse reportado *Amblyomma maculatum* y *Amblyomma ovale* (Glenny, 2002), siendo fácilmente diferenciados mediante la observación del tamaño de los palpos en relación a la base del capítulo (Keirans, 1989).

El uso de claves taxonómicas para la identificación morfológica es una herramienta que permite la discriminación de especies dentro del complejo *Rhipicephalus sanguineus* (Dantas-Torres, 2013), sin embargo, las similitudes morfológicas presentadas por dichas especies dificultan su diferenciación. La especie con mayor similitud a *Rhipicephalus sanguineus* s.l es *Rhipicephalus turanicus*, causando confusiones en su identificación (Walker, 2003). La diversidad morfológica presentada por *Rhipicephalus sanguineus* s.l hace necesario el uso de herramientas moleculares como el uso del gen mitocondrial 16S rADN gracias a la alta cantidad de regiones variables que presenta este gen (Takano, 2014) para una adecuada diferenciación de estas dos especies cercanamente relacionadas (Dantas-Torres, 2013) e identificar si pertenece al Linaje del Norte o del Sur reportado en América Latina (Moraes-Filho, 2011; Nava, 2012).

El análisis de las secuencias parciales de 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú muestran una escasa divergencia intraespecífica de 0-0.3% con las secuencias de Brasil A-B y Colombia pertenecientes al Linaje del Norte, esta divergencia genética ha sido previamente reportado en especímenes dentro de dicho linaje (Szabó, 2005; Moraes-Filho, 2011; Nava, 2012). Además, el análisis filogenético agrupa las secuencias del Perú junto a las secuencias de Brasil y Colombia (Linaje del Norte) de manera que los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir que las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú pertenecen al Linaje del Norte.

Los especímenes *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Perú provienen del distrito de Chiclayo, Departamento de Lambayeque que presentó una temperatura promedio de 27°C y 35°C y una humedad relativa de 78% entre los meses de Enero – Abril que fue el tiempo de muestreo, estos datos se relacionan con la distribución de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Linaje del Norte en países de clima tropical y subtropical (Moraes-Filho, 2011).

En este estudio las secuencias parciales de 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú (Linaje del Norte) presentaron una divergencia intraespecífica de 6.1-6.8% con las secuencias de Chile, Uruguay y Argentina (Linaje del Sur) similar a los encontrados por Nava (2012) al comparar secuencias parciales de 16S rADN de ambos linajes y mayor a los valores previamente reportados para las secuencias de 16S rADN entre *Rhipicephalus sanguineus* s.l y *Rhipicephalus guilhoni* con 3.3% (Latrofa, 2013), mostrando así un alto porcentaje de divergencia genética entre los dos linajes siendo incluso superior al presentado entre especies del género *Rhipicephalus* cercanamente relacionadas.

Además de la amplia divergencia genética intraespecífica mostrada entre *Rhipicephalus sanguineus* s.l de ambos linajes en este estudio (perteneciendo las secuencias del Perú al Linaje del Norte), Szabó (2005) demostró que *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Rafaela, Argentina (Linaje del Sur) fueron biológicamente incompatibles con especímenes de Jaboticabal, Brasil (Linaje del Norte) debido a que los híbridos de ambos linajes eran prácticamente estériles. Asimismo, divergencia en la morfología de ambos linajes fue reportado por Oliveira (2005) encontrando diferencias en el tamaño, forma del poro genital y características de las estructuras sensoriales bajo microscopía electrónica de barrido.

Por otro lado, las secuencias parciales de 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú fueron alineadas con las secuencias de Europa (España e Italia) y África (Sudáfrica). El árbol filogenético segregó los *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú con las secuencias de

Europa (divergencia genética de 5.8-6.5%) y las agrupó con la de Sudáfrica (mostrando 100% de identidad). La amplia divergencia genética de las secuencias del Perú frente a las secuencias europeas y la estrecha relación con las secuencias africanas puede deberse a la introducción de *Rhipicephalus sanguineus* s.l al Nuevo Mundo antes del siglo XV gracias a la migración humana proveniente de Asia y África (Leonard, 2002).

Asimismo, el porcentaje de divergencia intraespecífica entre secuencias del Perú y el linaje del Sur fue alcanzado por la divergencia mostrada por las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Jaboticabal-Brasil debido a que presenta un porcentaje de identidad del 100% con las secuencias del Perú. Las secuencias de Jaboticabal-Brasil han sido encontradas también en Venezuela, Panamá, Costa Rica y México (Moraes-Filho, 2011), por lo que se infiere que las secuencias encontradas en el Perú están estrechamente relacionadas con secuencias *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Sudamérica y Centroamérica.

Además de la amplia divergencia genética intraespecífica mostrada entre *Rhipicephalus sanguineus* s.l de ambos linajes en este estudio (perteneciendo las secuencias del Perú al Linaje del Norte), los especímenes hembras pertenecientes al Linaje del Norte muestran un menor periodo de ingurgitación y una mayor tasa de producción de huevos (Szabó, 2005). Es probable que estas características se relacionen con un ciclo biológico más corto, mayor frecuencia de infestación (Walker, 2003; Lord, 2014) y mayor transmisión de enfermedades debido al aumento de temperatura ambiental a consecuencia del cambio climático (Dantas-Torres, 2015; Ostfeld, 2015).

En el distrito de Chiclayo los casos de Ehrlichiosis canina han sido reportados con una prevalencia de 75.76% teniendo a *Rhipicephalus sanguineus* s.l como responsable de su transmisión (Oliva, 2015). Esta capacidad vectorial fue evaluada entre los dos linajes mostrando la habilidad de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Linaje del Norte para infectarse naturalmente con *Ehrlichia canis* (Cicutin, 2015) y su capacidad para transmitir la bacteria a la población canina relacionándose a su vez la distribución de garrapatas de dicho linaje con la presentación de Ehrlichiosis monocítica canina (Moraes-Filho, 2015).

La identificación molecular de secuencias genéticas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l en este estudio servirá de base para el establecimiento de mejores medidas de control y prevención de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Por ejemplo, identificando los mecanismos moleculares de resistencia implicados en la variación de sensibilidad a ciertos acaricidas (Dantas-Torres, 2008; Díaz, 2012) mediante la comparación de secuencias genéticas de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú con las de especímenes que han

presentado resistencia a diversos acaricidas (Miller, 2001; Fernandes, 2001; Estrada-Peña, 2005). Asimismo, nos permitirá evaluar la eficacia de protocolos de vacunación que han sido efectivos contra *Rhipicephalus sanguineus* s.l que presenten un alto porcentaje de identidad con las secuencias del Perú como los utilizados con éxito por Perez-Perez (2010) en la cual se usaron garrapatas provenientes de Jaboticabal, Brasil.

Por último, se hacen necesarios estudios que permitan identificar molecularmente *Rhipicephalus sanguineus* s.l de otros departamentos del Perú y clasificarlas de acuerdo al Linaje correspondiente, así como también identificar patógenos transmitidos a caninos y humanos y evaluar la competencia vectorial para dichos patógenos con la finalidad de entender mejor la epidemiología de las enfermedades transmitidas por *Rhipicephalus sanguineus* s.l en el Perú.

VI. CONCLUSIONES

1. La Identificación basada en criterios morfológicos identificó 297 especímenes *Rhipicephalus sanguineus* s.l.
2. Las secuencias del gen 16S rADN de *Rhipicephalus sanguineus* s.l del Perú resultaron 100% idénticas a las secuencias de Jaboticabal-Brasil y Sudáfrica.
3. El análisis filogenético identificó las secuencias de *Rhipicephalus sanguineus* s.l de Chiclayo, Lambayeque-Perú como pertenecientes al Linaje del Norte.

VII. LITERATURA CITADA

1. Abdullah HH, El Molla A, Salib F A, Allam N A, Ghazy A A, Abdel-Shafy S. 2016. Morphological and molecular identification of the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* and the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) vectors of Rickettsioses in Egypt. *Veterinary World*, 9(10), 1087-1101
2. Alvarez R. 2017. Revisión sobre la biología de *Rhipicephalus sanguineus* (Arthropoda, chelicerata)(Latreille, 1806). [Internet], [03 de enero del 2018]. Disponible en: <https://doi.org/10.7770/safer-V5N1-art1173>
3. Ammazalorso A D, Zolnik C P, Daniels T J, Kolokotronis S O. 2015. To beat or not to beat a tick: comparison of DNA extraction methods for ticks (*Ixodes scapularis*). [Internet], [15 de diciembre del 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26290800>
4. Barker, Burris, Sauer, Hai. 1973. Composition of Tick Oral Secretions Obtained by Three Different Collection Methods. *Journal of Medical Entomology, Oxford Academic*, 10(2): 198-201
5. Barker. 1998. Distinguishing species and populations of rhipicephaline ticks with its 2 ribosomal RNA. *The Journal of Parasitology*, 84(5), 887-892.
6. Beati L, Keirans J E. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *The Journal of Parasitology*, 87(1), 32-48.

7. Bechara, Szabó, Mukai, Rosa. 1994. Immunisation of dogs, hamsters and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* using crude unfed adult tick extracts. [Internet], [10 de diciembre del 2017]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304401794900388>
8. Bechara G, Szabó M, Ferreira B, Garcia M V. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Braz J Vet Parasitol*, 4, 61-66.
9. Black WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(21). 10034-10038.
10. Black WC, Klompen JS, Keirans JE. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 129-144.
11. Bowles DE, McHugh CP, Spradling SL. 1992. Evaluation of devices for removing attached *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 29(5), 901-902.}
12. Bowman, AS, Nuttall, PA. 2008. Ticks: biology, disease and control. 6ª ed. Cambridge: Cambridge University Press. 506p.
13. Burlini L, Teixeira K R, Szabó M P, Famadas K M. 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Experimental & Applied Acarology*, 50(4), 361-374.
14. Bustamante A. 1998. Prevalencia de Ectoparásitos en *Canis familiaris* de la Zona Climática Litoral de Lima Metropolitana Durante la Epoca de Invierno. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 21 p.
15. Cançado, Piranda E, Faccini J .2007. Influência do comportamento gregário nos processos de muda de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (acari: ixodidae), em condições laboratoriais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16(4), 205-210.
16. Caporale D A, Rich S M, Spielman A, Telford S R, Kocher T D. 1995. Discriminating between Ixodes Ticks by Means of Mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4(4), 361-365
17. Chitimia-Dobler L, Langguth J, Pfeffer M, Kattner S, Küpper T, Friese D, Dobler G. Guglielmone, Nava S. 2017. Genetic analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks parasites of dogs in Africa north of the Sahara based on mitochondrial DNA sequences. *Veterinary Parasitology*, 239, 1-6.

18. Cicuttin GL, Tarragona E L, De Salvo MN, Mangold A J, Nava, S. 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(6), 724-729.
19. Cicuttin G, Salvo MN, Silva D, Brito M, Nava, S. 2017. *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* del linaje templado (Acari. Ixodidae), provincia de Buenos Aires, Argentina. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 16(2), 93-96.
20. Crampton A, McKay I, Barker SC. 1996. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal for Parasitology*, 26(5), 511-517.
21. Crowder CD, Rounds MA, Phillipson CA, Picuri JM, Matthews HE, Halverson, J, Stuchzer SE, Eshoo MW. 2010. Extraction of total nucleic acids from ticks for the detection of bacterial and viral pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 47(1), 89-94.
22. Cruickshank R. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology*, 7, 3-14.
23. Dantas-Torres F, Figueredo L A, Brandão-Filho SP. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1), 64-67.
24. Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), 173-185.
25. Dantas-Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3, 26. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-26>
26. Dantas-Torres. 2015. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 1, 10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>. Ostfeld RS, Brunner JL. 2015
27. Dantas-Torres F, Maia C, Latrofa MS, Annoscia G, Cardoso L, Otranto D. 2017. Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. [Internet], [28 de diciembre del 2017]. Disponible en : <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2072-1>
28. Deevong P, Hongoh Y, Inoue T, Trakulnaleamsai S, Kudo T, Noparatnaraporn N, Ohkuma M. 2006. Effect of Temporal Sample Preservation on the Molecular Study of a Complex Microbial Community in the Gut of the Termite *Microcerotermes* sp. *Microbes and Environments - MICROBES ENVIRONMENTS*, 21, 78-85.

29. Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau, D. M., Eremeeva, M. E., McQuiston, J. H. 2005. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *The New England Journal of Medicine*, 353(6), 587-594.
30. Desloire S, Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. 2006. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Research*, 37(5), 725-732.
31. Díaz E. 2012. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 5(1), 72-81.
32. Duscher GG, Peschke R, Tichy A. 2012. Mechanical tools for the removal of *Ixodes ricinus* female ticks--differences of instruments and pulling or twisting? *Parasitology Research*, 111(4), 1505-1511.
33. Eremeeva, Bosserman, Demma, Zambrano, Blau, Dasch. 2006. Isolation and Identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Collected in Arizona. [Internet], [28 de junio del 2017]. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/72/8/5569.full>
34. Erster O, Roth A, Wolkomirsky R, Leibovich B, Shkap V. 2013. Comparative analysis of mitochondrial markers from four species of *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 198(3-4), 364-370.
35. Esser HJ, Herre E A, Blüthgen N, Loaiza JR, Bermúdez SE, Jansen PA. 2016. Host specificity in a diverse Neotropical tick community: an assessment using quantitative network analysis and host phylogeny. *Parasites & Vectors*, 9(1), 372
36. Estares J. 1999. Prevalencia de ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Lurigancho, San Martín de Porres, Comas e Independencia. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 36 p.
37. Estrada-Penã, A. 2005. Etude de la re'sistance de la tique brune du chien, *Rhipicephalus sanguineus* aux acaricides. *Rev. Med. Vet.* 156, 67-69.
38. Faccioli V. 2011. Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de la colección de invertebrados del museo provincial de ciencias naturales Florentino Ameghino. Zoología de Invertebrados. [Internet] Disponible en: <http://www.unl.edu.ar/santafe/museocn.htm>
39. Feldman-Muhsam. 1970. Salivary secretion of the male tick during copulation. *J. Insect Physiol.* 16: 1945-1949.
40. Feldman-Muhsam and S. Borut. 1971. Copulation in ixodid ticks. *The journal of parasitology*. 57(3): 630-634
41. Fernandes, F.F., Freitas, E.P., Silva, J.R., Silva, O.R., Silva, I.G. 2001. Efeitos toxicológicos e ineficácia in vitro de deltametrina sobre larvas de *Rhipicephalus sanguineus*, de Goiânia, Goiás, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34.159-165.

42. Ferreira BR, Szabó MJ, Cavassani KA, Bechara GH, Silva JS. 2003. Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. - PubMed - NCBI.115(1):35-48
43. Fukatsu T. 1999. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. [Internet], [03 de mayo del 2017]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-294x.1999.00795.x>
44. García M, Moissant E, Pérez A, Quijada J, Somies D, García H. 2007. Comportamiento natural de las fases no parasíticas de *Rhipicephalus sanguineus* (latreille, 1806) (acari: ixodidae) en un bioterio canino de Venezuela. [Internet], [28 de diciembre del 2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/959/95911668003.pdf>
45. García-García JC, Portillo A, Núñez M J, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. 2010. A Patient from Argentina Infected with *Rickettsia massiliae*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(4), 691-692.
46. Gil DC, Benítez JE, Gutiérrez MM. 2012. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del Dengue. *Iatreia*, 23(2), 146-156.
47. Gil Q, Carolina D, Benítez O, Emilio J, Martínez-Gutiérrez M. 2010. Competencia vectorial: consideraciones entomológicas y su influencia sobre la epidemiología del dengue. *Iatreia*, 146-156.
48. Glenny A, Mendoza U, Falconí R. 2002. Detección de anticuerpos contra *Borrelia burgdorferi* e identificación de garrapatas ixodidas en Piura y Amazonas, Perú [Internet], [15 julio 2007]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-46342004000100005.
49. González-Acuña D, Valenzuela G, Moreno L, Ardiles K, Guglielmone A. 2006. Nuevos hospedadores para las garrapatas *Amblyomma tigrinum* y *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) en Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(3), 273-275.
50. Gray J, Dantas-Torres F, Estrada Peña A, Levin M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick Borne Dis*, 4, 171-180.
51. Guerrero Puentes C. 2016. Problemática de la ehrlichiosis canina vista desde el aspecto teórico y el aspecto clínico en una clínica veterinaria de Bogotá (Central de Urgencias Veterinarias). [Internet], [03 de mayo del 2017]. Disponible en: <http://190.25.182.15:8080/jspui/handle/11158/632>
52. Guglielmone A A, Nava S. 2014. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names--with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa*, 3767, 1-256.

53. Halos L, Jamal T, Vial L, Maillard R, Suau A, Le Menach A, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat, M. 2004. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary Research*, 35(6), 709-713
54. Hill CG, Gutierrez, J. A. 2003. A method for extraction and analysis of high quality genomic
55. Hu C, Zhang S, Wang X. 2013. A Study on the Control Technique of Construction Project Process. *Engineering*, 05(03), 303-308.
56. Hubbard MJ, Cann, K J, Wright DJ. 1995. Validation and rapid extraction of DNA from alcohol-preserved ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 19(8), 473-478.
57. Inokuma H, Tamura K, Onishi T. 1996. Seasonal occurrence of *Rhipicephalus sanguineus* in Okayama Prefecture, Japan and effect of temperature on development of the tick. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 58(3), 225-228.
58. Inokuma H., Tamura K, Onishi T. 1997. Dogs develop resistance to *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 68(3), 295-297.
59. James H, Oliver Jr. 1989. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida) | Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. [Internet], [10 de enero del 2017]. Disponible en: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.20.110189.002145>
60. Jizhou Lv, Shaoqiang Wu, Yongning Zhang, Yan Chen, Chunyan Feng, Xiangfen Yuan, Guangle Jia, Junhua Deng, Caixia Wang, Qin Wang, Lin Mei and Xiangmei Lin. 2014. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites and Vectors*, 7,93.
61. Jittapalapong S, Stich RW, Gordon JC, Wittum TE, Barriga O. 2000. Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology*, 37(4), 601-611.
62. Jittapalapong, Sathaporn, Jansawan W, Gingkaew A, Barriga O, Stich RW. 2004. Protection of dairy cows immunized with tick tissues against natural *Boophilus microplus* infestations in Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026, 289-297.
63. Jones, Gruntmeir, Hamer, Little. 2017. Temperate and tropical lineages of brown dog ticks in North America. [Internet], [13 de marzo del 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939016302453>
64. Jongejan F, Uilenberg G. 1994. Ticks and control methods. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, 13(4), 1201-1226.

65. Kazimírová M, Štibrániová I. 2013. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00043>
66. Keirans JE. 1985. George Henry Falkiner Nuttall and the Nuttall tick catalogue. *U S Dept Agric, Agric Res Ser Misc Pub (1438)*, 1.785.
67. Keirans , Litwak. 1989. Pictorial key to the adults of hard ticks, Family Ixodidae (Ixodidae: Ixodoidea), East of the Mississippi River. *J. Med Entomol*, 26: 435-448.
68. Kelehear C, Spratt D, O'Meally D, Shine R. 2014. Pentastomids of wild snakes in the Australian tropics. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, 20-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2013.12.003>
69. King JR, Porter SD. 2004. Recommendations on the use of alcohols for preservation of ant specimens (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux*, 51(2), 197-202. <https://doi.org/10.1007/s00040-003-0709-x>
70. Koch, H. 1982. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 75, 583-586.
71. Koch, Tuck. 1986. Molting and Survival of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) under Different Temperatures and Humidities. [Internet], [1 de febrero del 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/233677743_Molting_and_Survival_of_the_Brown_Dog_Tick_Acari_Ixodidae_under_Different_Temperatures_and_Humidities
72. Krantz GW, Walter DE. 2009. A manual of acarology. 3rd ed. Lubbock (TX): Texas Tech University Press.
73. Labruna, M. 2004. Biológica – Ecología de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 13 (suppl 1): 123-124.
74. Latrofa M, Dantas-Torres F, Annoscia G, Cantacessi C, Otranto D. 2013. Comparative analyses of mitochondrial and nuclear genetic markers for the molecular identification of *Rhipicephalus* spp. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 20, 422-427.
75. Leguia P. 1996. Enfermedades Parasitarias de Perros y Gatos. Editorial de Mar EIRL. Lima-Perú. 127.
76. Leonard, J.A., Wayne, R.K., Wheeler, J., Valadez, R., Guillen, S., Vila, C., 2002. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Science*. 298, 1613-1616.
77. Levin ML, Studer E, Killmaster L, Zemtsova G, Mumcuoglu, K Y. 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental & Applied Acarology*, 58(1), 51-68.

78. Levy S. 2002. Tick Biology: Understanding the life cycle of ticks offers insight on how they transmit diseases to dogs. [Internet], [14 de febrero del 2018]. Disponible en: http://files.dvm360.com/alfresco_images/DVM360//2013/11/19/cc_24bf18-519b-49fe-89b7-640988f757ca/article-32677.pdf
79. Liberato W. 1998. Prevalencia de Ectoparásitos en *Canis familiaris* en los distritos de San Juan de Miraflores, Villa María del Triunfo y Villa El Salvador. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 21 p.
80. Lord CC. 2014. Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* Latreille (Arachnida: Acari: Ixodidae). EDI [Internet], [15 julio 2015]. Disponible en: <https://edis.ifas.ufl.edu/in378>
81. Lorenzana C. 2005. Infestación por garrapatas del perro. [Internet], [01 de febrero del 2018]. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/13275039/infestacion-por-garrapatas-en-el-perro-laboratoriouniversalcom>
82. Louly C, Fonseca IN, Oliveira VF, Linhares G, Menezes L B , Borges LM. 2007. Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. *Ciência Rural*, 37(2), 464-469.
83. Maia C, Ferreira A, Nunes M, Vieira M L, Campino L, Cardoso L. 2014. Molecular detection of bacterial and parasitic pathogens in hard ticks from Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(4), 409-414.
84. Mandrioli M, Borsatti F, Mola L. 2006. Factors affecting DNA preservation from museum- collected lepidopteran specimens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 120, 239-244. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00451.x>
85. Mangold A, Bargues M, Mas-Coma S. 1997. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). [Internet], [20 de julio del 2017]. Disponible en: <https://www.lahey.org/Studies/>
86. Mangold A J, Bargues M D, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84(6), 478-484.
87. Mans B, Neitz AW. 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(1), 1-17.
88. Márquez J, Hidalgo P, Contreras C, Rodríguez L, Muniain. 2005. Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. [Internet], [10 de julio del 2017]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X05749156>
89. Martin R, Cuellar Del Hoyo C, Olmeda A, Rodríguez J. 1994. Immunological response in rabbits infested with *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 8(3), 238-244.

90. Mateus, Cala, Vargas, Castellanos. 2007. Reporte de casos clínicos con Hepatozoon canis en el Centro Reporte de casos clínicos con Hepatozoon canis en el Centro Colombia. [Internet], [22 de julio del 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/26459186_Reporte_de_casos_clinicos_con_Hepatozoon_canis_en_el_Centro_Reporte_de_casos_clinicos_con_Hepatozoon_canis_en_el_Centro_Colombia
91. Miller, R.J., George, J.E., Guerrero, F., Carpenter, L., Welch, J.B. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *J. Med. Entomol.* 38, 298–302.
92. Miller S E. 2007. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 4775-4776.
93. Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos F A, Richtzenhain L J, Labruna M B. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*, 117(1), 51-55.
94. Moraes-Filho, Krawczak, Costa, Soares, Labruna. 2015. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. [Internet], [14 de febrero del 2017]. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139386>
95. Mtambo J, Van Bortel W, Madder M, Roelants P, Backeljau T. 2006. Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for reliable DNA amplification by PCR. *Experimental & Applied Acarology*, 38(2-3), 189-199.
96. Mukai L S, Netto A C, Szabo M, Bechara GH. 2002. Hypersensitivity induced in dogs by nymphal extract of *Amblyomma cajennense* ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969, 184-186.
97. Murrell A, Campbell N J, Barker S C. 2000. Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1), 1-7.
98. Nava S, Mastropaolo M, Venzal J M, Mangold A J, Guglielmone A A. 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4)
99. Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MP, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone A A. 2015. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*, 208(1-2), 2-8.
100. Needham GR. 1985. Evaluation of five popular methods for tick removal. *Pediatrics*, 75(6), 997-1002.

101. Norris D, Klompen H, Black W. 1999. Comparison of the Mitochondrial 12S and 16S Ribosomal DNA Genes in Resolving Phylogenetic Relationships Among Hard Ticks (Acari: Ixodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 92, 117-129.
102. Nuntón Ch, Quintana C, Vivar D. 2013. Prevalencia de ectoparásitos y endoparásitos en *Canis familiaris* sacrificados en Tumbes; julio – diciembre, 2013. *Revista de investigación científica*. 10(2): 93-97.
103. O’Farril, 2005. La garrapata marrón del perro. Internet [Noviembre 2005] Disponible en: <http://academic.uprm.edu/ofarrill>.
104. Oliva J. 2015. Determinación de Ehrlichiosis canina en la ciudad de Chiclayo, mediante diagnóstico clínico y hematológico directo durante Enero- Octubre 2014. Tesis de Médico Veterinario. Chiclayo: Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. 79 p.
105. Oliveira P, Bechara G, Denardi S, Saito K, Nunes E, Szabó M, Camargo M. 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina *Veterinary Parasitology*, 129, 139-147.
106. Olmeda S, Valcárcel F. El papel de las garrapatas como transmisoras de enfermedades en España. [Internet], [15 de julio del 2017]. Disponible en: <http://femp.femp.es/files/3580-1620-fichero/Sonia%20Olmeda.pdf>
107. Ostfeld RS, Brunner JL. 2015. Climate change and Ixodes tick-borne Diseases of humans. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370:20140051. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0051>
108. Otranto D, Dantas-Torres F, Tarallo VD, Ramos RA, Stanneck D, Baneth G, de Caprariis D. 2012. Apparent tick paralysis by *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs. - PubMed - NCBI. 188(3-4):325-9
109. Palumbi, S. R. (1996). Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. En: D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, Eds. *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA. p 205–247.
110. Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), 897-928.
111. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier P, Sotto A, Raoult D. 2008. Warmer Weather Linked to Tick Attack and Emergence of Severe Rickettsioses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>
112. Paz GF, Labruna MB, Leite RC. 2008. Ritmo de queda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de cães artificialmente infestados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(3), 139-144.
113. Pegram RG, Keirans JE, Clifford CM, Walker. 1987. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related

species. [Internet], [14 de febrero del 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00009100>

114. Perez-Perez D, Bechara GH, Machado R Z, Andrade G M, Del Vecchio R, Pedroso M S, Farnós, O. (2010). Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.034>

115. Phillips A, Simon C. 1995. Simple, efficient, and nondestructive DNA extraction protocol for arthropods. [Internet], [21 de agosto del 2017] Disponible en: https://nature.berkeley.edu/~oboyski67/download/Museum_DNA/Phillips%20Simon%201995.pdf

116. Quiroz, H. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Ed. México D.F: Editorial Limusa. 765-779p.

117. Ramírez B, Everts Ch, Barboza G, Fernández G, Valera Z, Villalobos Angulo F. 2008. Garrapatas (Acari: Ixodidae) recolectadas de caninos bajo asistencia veterinaria en Maracaibo, Venezuela. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 18(3): 267-270.

118. Ramírez., A. 2014. Identificación Molecular y Análisis de la Relación Filogenética de Especies de Rickettsias Presentes en Garrapatas Provenientes de Tres Regiones de Colombia. Tesis Magister. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina. Bogotá D.C., Colombia.

119. Rees H H. 2004. Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology*, 129 Suppl, S127-143.

120. Robles, D. 2008. Diagnóstico de la Ehrlichiosis canina basada en los Hallazgos Clínico-Hematológicos de los caninos atendidos en el centro veterinario "San Martín" de la ciudad de Trujillo durante Marzo 2006 a Marzo 2007. Tesis de Médico Veterinario. Trujillo: Univ. Nac. Pedro Ruiz Gallo. 72 p.

121. Rodríguez I, Fraga J, Noda A A, Mayet M, Duarte Y, Echevarria E, Fernández C. 2014. An Alternative and Rapid Method for the Extraction of Nucleic Acids from Ixodid Ticks by Potassium Acetate Procedure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(4), 542-547.

122. Rovey C, Brouqui P, Raoult D. 2008. Questions on Mediterranean Spotted Fever a Century after Its Discovery. *Emerg Infect Dis*, 14(9): 1360–1367.

123. Sanches GS, de Oliveira PR, André MR, Machado RZ, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2012. Copulation is necessary for the completion of a gonotrophic cycle in the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Journal of Insect Physiology*, 58(7), 1020-1027.

124. Santa Cruz AM, O Prieto, OJ Lombardero, L Gómez, N Schleiber. 1998. First finding of *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) infesting *Didelphis albiventris*

(Marsupialia: Didelphidae) in the province of Corrientes, Argentina. Resúmenes XIII Congreso Asociación Mundial Medicina Veterinaria de Pequeños Animales, Buenos Aires 2, 787.

125. Serra-Freire NM. 2010. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria*, 19(3), 141-147.

126. Silveira J A, Passos L M, Ribeiro M F. 2009. Population dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4), 270-275.

127. Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet S I. 2017. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7.

128. Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. [Internet], [10 de enero del 2018]. Disponible en <https://academic.oup.com/aesa/article-abstract/87/6/651/19291?redirectedFrom=fulltext>

129. Sonenshine D E. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review of Entomology*, 51, 557-580.

130. Song S, Shao R, Atwell R, Barker S, Vankan D. 2011. Phylogenetic and phylogeographic relationships in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatus* (Acari: Ixodidae) inferred from COX1 and ITS2 sequences. *International Journal for Parasitology*, 41(8), 871-880.

131. Srivastava SC, Varma MG. 1964. Culture of the Tick *Rhipicephalus Sanguineus* (Latreille) (Ixodidae) in the Laboratory. *Journal of Medical Entomology*, Oxford Academic, 1(2): 154-157

132. Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nürnberger S. 2017. Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*.

133. Szabó MP, Bechara G. 1999. Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Experimental and Applied Acarology*, 23(11), 915-928.

134. Szabó M P, Cunha T M, Pinter A, Vicentini F. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 25(10-11), 909-916.

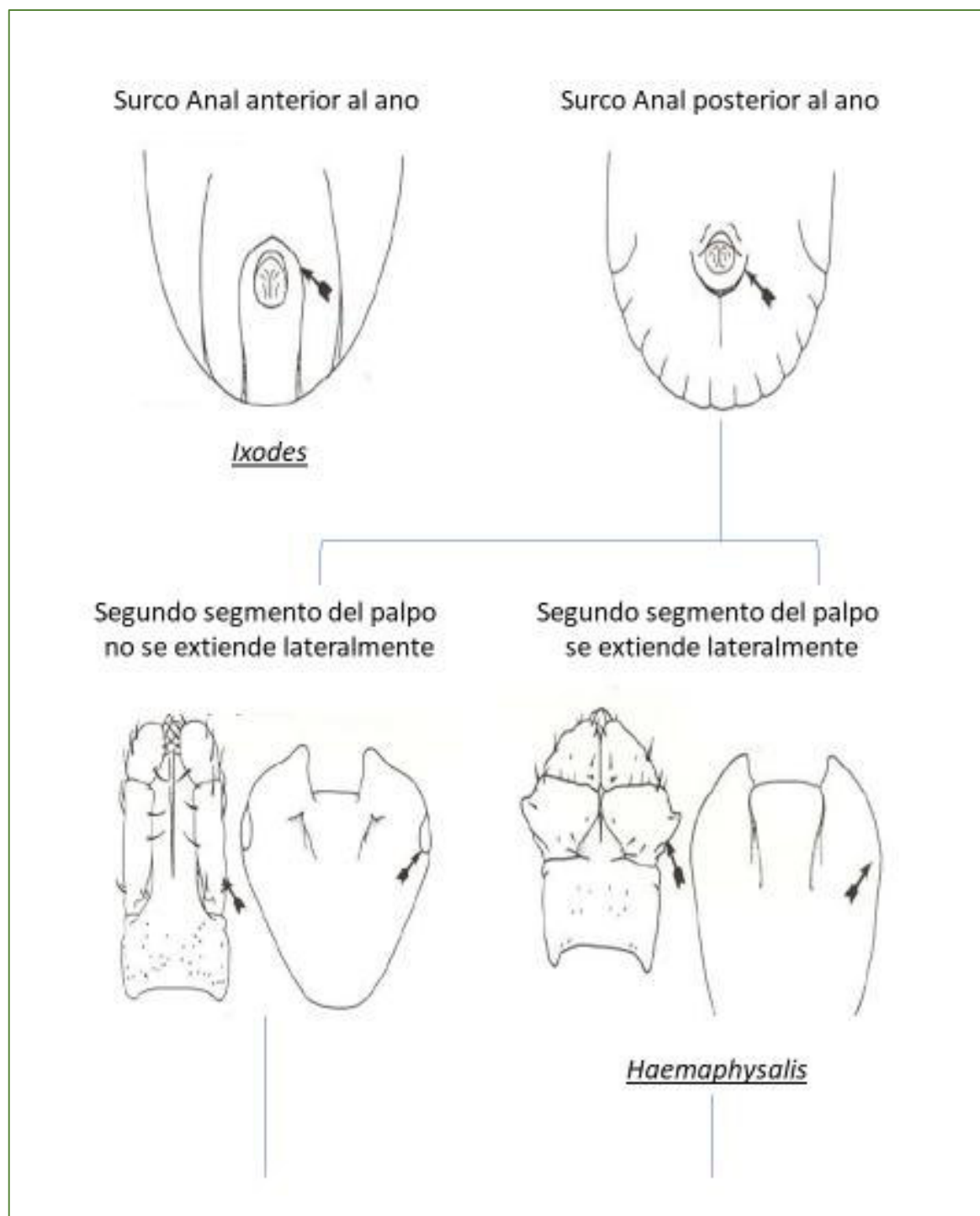
135. Szabó MP, Aoki VL, Sanches FP, Aquino LP, Garcia MV, Machado RZ, Bechara GH. 2003. Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. *PubMed - NCBI Vet Parasitología*. 115(1):49-59.

136. Szabó, M P, Mangold A J, João C F, Bechara G H, Guglielmone A A. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology*, 130(1-2), 131-140.
137. Takano A, Fujita H, Kadosaka T, Takahashi M, Yamauchi T, Ishiguro F, Takada N, Yano Y, Oikawa Y, Honda T, Gokuden M, Tsunoda T, Tsurumi M, Ando S, Andoh M, Sato K y Kawabata H. 2014. Construction of a DNA database for ticks collected in Japan: application of molecular identification base on mitochondrial 16 rDNA gene. *Med Entomol Zool*. 65(1), 13-21.
138. Tatchell R J, Moorhouse DE. 1968. The feeding processes of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). II. The sequence of host-tissue changes. *Parasitology*, 58(2), 441-459.
139. Tavarez K, Bretanha P, Oliveira L, Correa M, Silveira E. 2014. *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Ixodidae) in synantropic rodents in Rio Grande do Sul, Brazil. *J. Vet. Parasitol., Jaboticabal* 23(2), 276-279.
140. Tayutivutikul J, Pongprasert W, Royce L, Ruangrit K. 2003. Comparison of Preservation Techniques for Silkworm (*Bombyx mori* L.) DNA Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Products. *Chiang Mai University Journal*, 2.
141. Tinoco-Gracia L, Quiroz-Romero H, Quintero-Martínez M T, Rentería-Evangelista T B, González-Medina Y, Barreras-Serrano A, Hori- Oshima, Moro MH, Vinasco J. 2009. Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *The Veterinary Record*, 164(2), 59-61.
142. Troughton D R, Levin M L. 2007. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology*, 44(5), 732-740.
143. Venzal J M, Estrada Pena A, Castro O, Souza D, Portillo A, Oteo JA. 2007. Study on seasonal activity in dogs and ehrlichial infection in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) from southern Uruguay. *Parasitología latinoamericana*, 62(1-2), 23-26.
144. Venzal, Gonzáles, Martins, Guglielmone. 2017. Ticks of the Southern Cone of America. [Internet], [10 de enero del 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128110751>
145. Veronez VA, de Castro M B, Bechara G H, Szabó M P. 2010. Histopathology of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts. *Experimental and Applied Acarology*, 50(2), 151-161. <https://doi.org/10.1007/s10493-009-9286-7>
146. Walker A, Bouattour A, Camicas J, Estrada-Peña A, Horak Latif, Latif A, Pegram R, Preston P. 2003. *Ticks of Domestic Animals in Africa: a guide to identification of species*. [Internet], [02 de agosto del 2017]. Disponible en <http://www.alanrwalker.com/assets/PDF/tickguide-africa.pdf>
147. White D J, Wolff JN, Pierson M, Gemmell NJ. 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*, 17(23), 4925-4942.

148. Winkel K T, Ribeiro P B, Antunes L O, Cárcamo M C, Vianna E E. 2014. *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Ixodidae) in synantropic rodents in Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro De Parasitologia Veterinaria*, 23(2), 276-279.
149. Zahler M, Filippova NA, Morel PC, Gothe R, Rinder H. 1997. Relationships between species of the *Rhipicephalus sanguineus* group: a molecular approach. *The Journal of Parasitology*, 83(2), 302-306.
150. Zhang R L, Zhang B. 2014. Prospects of using DNA barcoding for species identification and evaluation of the accuracy of sequence databases for ticks (Acari: Ixodida). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), 352-358.

VIII. APÉNDICE

Apéndice 1. Clave para la clasificación de los géneros en estado adulto de *Ixodidae* (Keirans y Litwak, 1989).

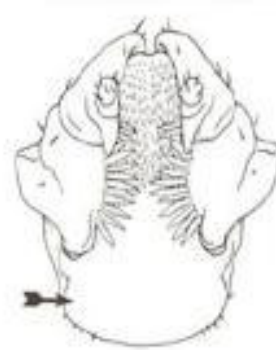


Dentición del hipostoma 3/3
Cuerno ventral presente



H. leporispalustris

Dentición del hipostoma 5/5
Cuerno ventral ausente



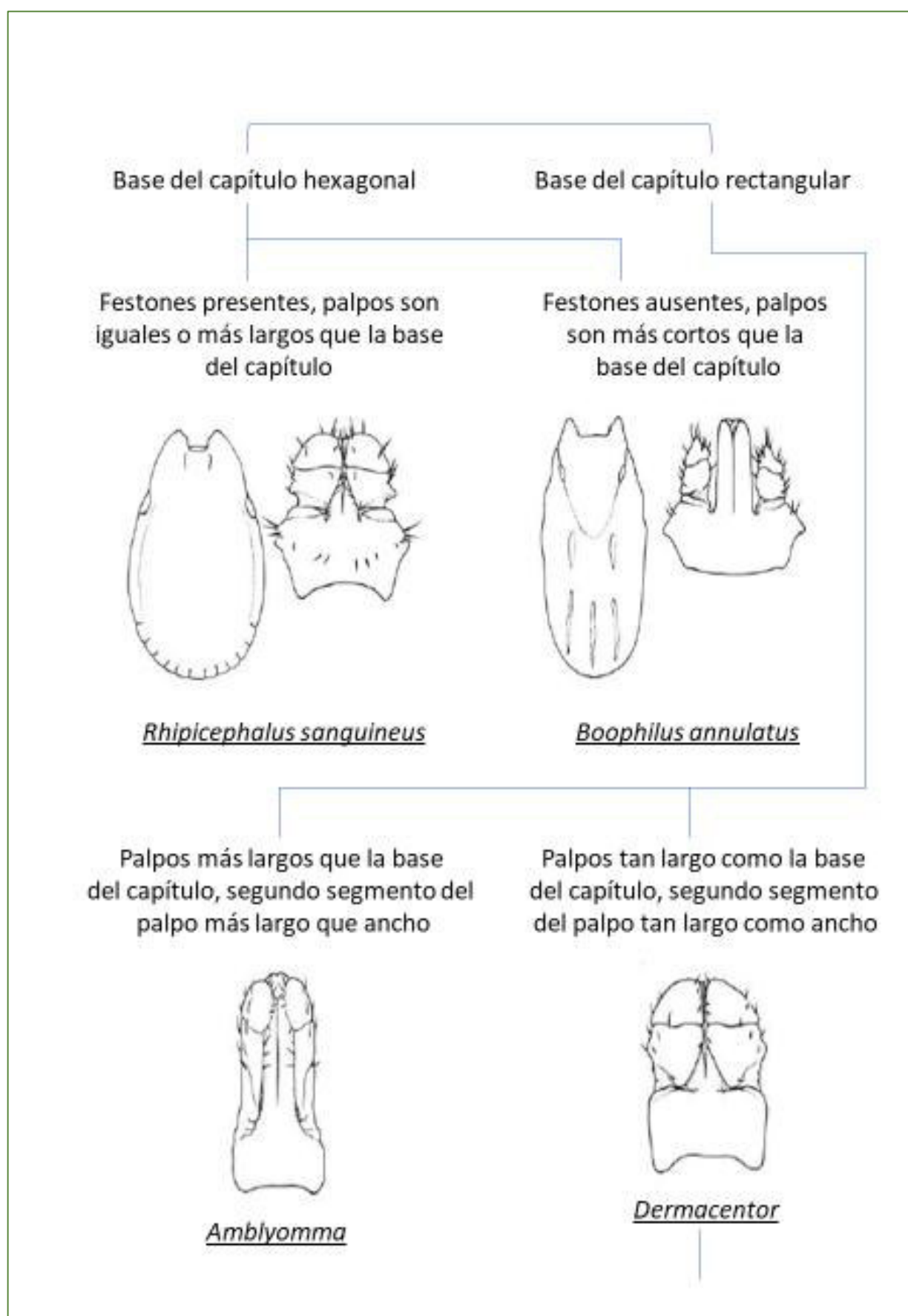
H. chordellis

Base del capítulo hexagonal

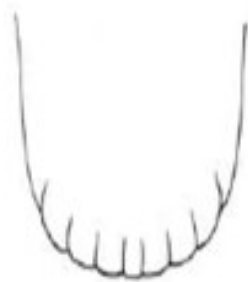


Base del capítulo rectangular





Número de festones 7



D. (Anocentor) nitens

Número de festones 11



D. (Anocentor) spp.

Placa espiracular con
copas largas



D. albipictus

Placa espiracular con
copas pequeñas



D. variabilis